

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
Departamento de Química Analítica



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas para  
la detección de marcadores inflamatorios y de cáncer de  
mama**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Unai Eletxigerra Hernández**

**Director**

**Miguel Ruiz Massip**

**Madrid, 2018**

---

# **Desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas para la detección de marcadores inflamatorios y de cáncer de mama**

---



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Química Analítica

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR**

*Presentada por*  
**Unai Eletxigerra Hernández**

*Dirigida por los Doctores*  
**Susana Campuzano Ruiz**  
**Reynaldo Villalonga Santana**  
**Jesús Martínez Perdiguero**

**Madrid, 2017**



# Desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas para la detección de marcadores inflamatorios y de cáncer de mama

*Memoria presentada para optar al título de Doctor*

**Madrid, 2017**

*Dirigida por los Doctores*  
**Susana Campuzano Ruiz**  
**Reynaldo Villalonga Santana**  
**Jesús Martínez Perdiguero**







Universidad Complutense de Madrid

Dpto. Química Analítica - Facultad de CC. Químicas - Ciudad Universitaria. 28040 Madrid

Tfno.: 34 913944331 Fax: 34 913944329 E-mail: depquian@ucm.es

**DOÑA MARIA CRUZ MORENO BONDI, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA  
DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**HACE CONSTAR:**

Que el trabajo titulado “*Desarrollo de plataformas biosensoras electroquímicas para la detección de marcadores inflamatorios y de cáncer de mama*” ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores **Susana Campuzano Ruiz, Reynaldo Villalonga Santana y Jesús Martínez Perdiguero**, constituyendo la Tesis Doctoral de su autor.

Madrid, 6 de Abril de 2017

**Fdo. María Cruz Moreno-Bondi**

**Fdo. Susana Campuzano Ruiz**

**Fdo. Reynaldo Villalonga Santana**

**Fdo. Jesús Martínez Perdiguero**

**Fdo. Unai Eletxigerra Hernández**



# Índice

<b>Abstract</b>	<b>XIX</b>
<b>Resumen</b>	<b>XXIII</b>
<b>1. Objetivos y plan de trabajo</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>3</b>
2.1. Biomarcadores proteicos de relevancia clínica . . . . .	4
2.1.1. Biomarcadores de inflamación . . . . .	5
2.1.1.1. $TNF\alpha$ . . . . .	6
2.1.2. Biomarcadores de cáncer de mama . . . . .	7
2.1.2.1. ErbB2 . . . . .	8
2.1.2.2. $ER\alpha$ . . . . .	9
2.1.2.3. PR . . . . .	10
2.2. Técnicas convencionales para determinación de marcadores clí- nicos de naturaleza proteica . . . . .	11
2.2.1. Técnicas para la detección de $TNF\alpha$ . . . . .	12
2.2.2. Técnicas para la detección de biomarcadores de cáncer de mama . . . . .	14
2.2.2.1. Técnicas para la detección de ErbB2 . . . . .	14
2.2.2.2. Técnicas para la detección de $ER\alpha$ . . . . .	16
2.2.2.3. Técnicas para la detección de PR . . . . .	16
2.3. Biosensores electroquímicos en análisis clínico . . . . .	16
2.3.1. Inmunosensores . . . . .	17

2.3.1.1. Anticuerpos . . . . .	17
2.3.2. Detección electroquímica . . . . .	18
2.3.2.1. Empleo de MBs . . . . .	18
2.3.3. Solución propuesta . . . . .	19
<b>3. Parte experimental</b>	<b>23</b>
3.1. Instrumentación . . . . .	23
3.1.1. Medidas electroquímicas . . . . .	23
3.1.1.1. Técnicas electroquímicas principales . . . . .	23
Amperometría . . . . .	25
DPV . . . . .	25
3.1.1.2. Electroodos . . . . .	25
3.1.2. Equipo SPR . . . . .	26
3.1.2.1. Principio de funcionamiento del SPR . . . . .	26
3.1.3. Otros instrumentos . . . . .	31
3.2. Reactivos y disoluciones . . . . .	32
3.2.1. Reactivos . . . . .	32
Reactivos para la preparación de disoluciones . . . . .	32
Reactivos empleados en la preparación de superficies . . . . .	33
MBs . . . . .	33
AuNPs . . . . .	33
Inmunoreactivos, marcadores enzimáticos y mediadores . . . . .	34
3.2.2. Disoluciones . . . . .	35
3.2.3. Muestras . . . . .	36
3.3. Procedimientos experimentales . . . . .	37
3.3.1. Manipulación de las MBs . . . . .	37
3.3.2. Funcionalización de las HOOC-MBs . . . . .	38
3.3.3. Magnetoinmunoensayo . . . . .	38
3.3.4. Funcionalización superficial de SPCEs . . . . .	39

---

3.3.4.1. Unión covalente . . . . .	40
3.3.4.2. Adsorción física . . . . .	40
3.3.5. Determinación electroquímica en SPCEs . . . . .	41
3.3.6. Preparación de la SAM sobre superficies de oro . . . . .	41
3.3.7. Funcionalización de los chips de SPR . . . . .	42
3.3.7.1. Preconcentración de la molécula de captura . . .	43
3.3.8. Medidas <i>label-free</i> en SPR . . . . .	43
3.3.9. Amplificación mediante AuNPs en SPR . . . . .	44
3.3.10. Regeneración superficial de los chips de SPR . . . . .	45
3.3.11. Preparación de cultivos celulares . . . . .	45
3.3.12. Obtención de lisados celulares . . . . .	45
3.3.13. Análisis de SDS–PAGE e inmunodetección . . . . .	46
3.3.14. Obtención de muestras de suero . . . . .	46
3.4. Cálculos . . . . .	46
3.4.1. Curvas de calibración . . . . .	46
3.4.1.1. Intervalo de confianza . . . . .	47
3.4.1.2. Significación estadística . . . . .	48
3.4.1.3. Método de las adiciones estándar . . . . .	48
3.4.2. Características analíticas . . . . .	48
3.4.2.1. LD y LQ . . . . .	48
3.4.2.2. RSD . . . . .	48
3.4.2.3. Estudios de recuperación . . . . .	50
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>51</b>
4.1. Determinación de biomarcadores de inflamación . . . . .	51
4.1.1. Inmunosensor amperométrico integrado para la deter- minación de $\text{TNF}\alpha$ . . . . .	52
4.1.1.1. Fabricación del chip desechable . . . . .	52
Funcionalización superficial . . . . .	53
Integración de los componentes fluidicos . . . . .	53

4.1.1.2.	Elección de la estrategia de funcionalización superficial óptima . . . . .	54
4.1.1.3.	Optimización de las variables experimentales . .	55
	Combinación de pasos en la formación del inmunocomplejo . . . . .	55
	Tiempo de incubación . . . . .	58
4.1.1.4.	Especificidad del sensor . . . . .	59
4.1.1.5.	Caracterización del sensor . . . . .	61
4.1.1.6.	Medidas en suero . . . . .	64
4.1.2.	Magnetoinmunosensor amperométrico para la determinación de $\text{TNF}\alpha$ . . . . .	65
4.1.2.1.	Optimización de las variables experimentales . .	67
	Cantidad de $\text{HOOC-MBs}$ . . . . .	67
	Concentración del anticuerpo de captura . . . . .	68
	Concentración del anticuerpo de detección . . . . .	70
	Concentración del marcador enzimático . . . . .	71
	Tiempos de incubación . . . . .	72
	Resumen de los parámetros óptimos . . . . .	72
4.1.2.2.	Especificidad del inmunoensayo . . . . .	74
4.1.2.3.	Características analíticas . . . . .	74
	Selectividad del inmunosensor . . . . .	79
	Análisis de muestras de suero humano . . . . .	80
4.2.	Determinación de biomarcadores de cáncer de mama . . . . .	89
4.2.1.	Estrategia SPR . . . . .	90
4.2.1.1.	Inmunosensor SPR para detección de ErbB2 . . .	90
4.2.1.2.	Biofuncionalización superficial del sensor . . . .	91
4.2.1.3.	Optimización de variables experimentales . . . .	94
4.2.1.4.	Análisis de muestras de suero . . . . .	102
4.2.1.5.	Análisis de lisados celulares . . . . .	103
4.2.2.	Magnetoinmunosensores amperométricos . . . . .	105
4.2.2.1.	Determinación individual de biomarcadores . . .	105

---

ErbB2 .....	105
ER $\alpha$ .....	124
PR .....	137
4.2.2.2. Multideterminación de biomarcadores .....	147
<b>5. Conclusiones</b>	<b>153</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>157</b>
<b>Acrónimos</b>	<b>171</b>
<b>Publicaciones derivadas</b>	<b>177</b>





# Índice de figuras

3.1. Bipotenciostato/galvanostato $\mu$ STAT 400 de Dropsens. . . . .	24
3.2. Circuito electrónico esquemático del potenciostato. . . . .	24
3.3. Tipos de electrodos empleados de Dropsens. . . . .	25
3.4. Equipo SPR2 de Sierra Sensors . . . . .	27
3.5. Chip de SPR de Sierra Sensors . . . . .	27
3.6. Composición de la celda microfluídica . . . . .	27
3.7. Sistema de aislamiento hidrodinámico . . . . .	28
3.8. Diferentes zonas de sensado . . . . .	28
3.9. Sensograma de SPR . . . . .	29
3.10. Ángulo de mínima reflexión . . . . .	29
3.11. Sensor de SPR, configuración de Kretschmann . . . . .	30
3.12. Separador magnético Dyna-Mag2 de Invitrogen. . . . .	31
3.13. Base magnética . . . . .	32
3.14. Manipulación de las MBs. . . . .	37
3.15. Funcionalización de las HOOC-MBs . . . . .	38
3.16. Proceso del magnetoinmunoensayo . . . . .	39
3.17. Medidas en chips desechables . . . . .	41
3.18. Formación de la SAM sobre el chip de SPR. . . . .	42
3.19. Optimización de pH. . . . .	44
3.20. Amplificación de la señal de SPR con AuNPs . . . . .	44
3.21. Método de las adiciones estándar . . . . .	49
3.22. LD y LQ . . . . .	49

4.1. Despiece del chip desechable . . . . .	54
4.2. Efecto de la estrategia de funcionalización . . . . .	56
4.3. Influencia del número de etapas . . . . .	57
4.4. Efecto del tiempo de incubación . . . . .	58
4.5. Especificidad del sensor . . . . .	60
4.6. Curva de calibración en el rango lineal . . . . .	62
4.7. Curva de calibración . . . . .	63
4.8. Inmunocomplejo de TNF $\alpha$ sobre HOOC-MBs . . . . .	66
4.9. Esquema de la determinación . . . . .	67
4.10. Optimización de la cantidad de HOOC-MBs . . . . .	68
4.11. Optimización de la concentración de antiTNF $\alpha$ . . . . .	69
4.12. Optimización de la concentración de biotina-antiTNF $\alpha$ . . . . .	70
4.13. Optimización de la concentración de SAV-HRP . . . . .	71
4.14. Optimización del tiempo de incubación de SAV-HRP . . . . .	73
4.15. Especificidad del sensor . . . . .	75
4.16. Curva de calibración en PBST . . . . .	76
4.17. Estabilidad de las MBs modificadas . . . . .	78
4.18. Selectividad del inmunosensor . . . . .	79
4.19. Curva de calibración en suero . . . . .	81
4.20. Suplementación del suero . . . . .	82
4.21. Efecto del volumen de muestra . . . . .	83
4.22. Tramo lineal de la calibración en suero . . . . .	85
4.23. Unión de pasos del inmunoensayo . . . . .	86
4.24. Sensograma de funcionalización . . . . .	92
4.25. Ensayos de regeneración . . . . .	93
4.26. Sensogramas para ErbB2 . . . . .	94
4.27. Curva de calibración de ErbB2 . . . . .	95
4.28. Optimización de la concentración de biotina-antiErbB2 . . . . .	97
4.29. Optimización de tamaño y concentración de AuNPs . . . . .	98
4.30. Sensograma de la detección deErbB2 . . . . .	99

4.31. Curva de calibración de ErbB2 . . . . .	100
4.32. Sensograma de la amplificación con AuNPs . . . . .	100
4.33. Comparación entre los dos inmunoensayos . . . . .	101
4.34. Sensograma de detección de ErbB2 en suero . . . . .	102
4.35. Curva de calibración de ErbB2 en suero . . . . .	103
4.36. Sensograma de detección de ErbB2 en lisados celulares . . . . .	104
4.37. Inmunosensor para la detección de ErbB2 . . . . .	106
4.38. Optimización de la concentración de antiErbB2 . . . . .	108
4.39. Optimización de la concentración de antiErbB2–HRP . . . . .	109
4.40. Efecto del número de etapas y el tiempo de incubación . . . . .	110
4.41. Curva de calibración en PBST . . . . .	112
4.42. Selectividad del inmunosensor . . . . .	113
4.43. Expresión de ErbB2 por Western Blot . . . . .	116
4.44. Determinación de ErbB2 en lisados celulares . . . . .	116
4.45. Detección en una mezcla de diferentes lisados . . . . .	117
4.46. Detección de ErbB2 en células intactas . . . . .	118
4.47. Micrografías de complejos célula-MBs . . . . .	120
4.48. Esquema del sensor de ER $\alpha$ . . . . .	125
4.49. Optimización de la concentración de antiER $\alpha$ . . . . .	126
4.50. Optimización de la concentración de biotina–antiER $\alpha$ . . . . .	127
4.51. Efecto del tiempo de incubación . . . . .	128
4.52. Unión de pasos del inmunoensayo . . . . .	130
4.53. Curva de calibración en PBST . . . . .	131
4.54. Selectividad del inmunosensor . . . . .	132
4.55. Determinación de ER $\alpha$ en lisados celulares. . . . .	134
4.56. Expresión de ER $\alpha$ por Western Blot . . . . .	135
4.57. Determinación del nivel de expresión de ER $\alpha$ en células intactas . . . . .	136
4.58. Micrografías de complejos célula-MBs . . . . .	137
4.59. Esquema del sensor de PR . . . . .	138
4.60. Optimización de la concentración de antiPR . . . . .	139

---

4.61. Optimización de la concentración de biotina–antiPR . . . . .	140
4.62. Curva de calibración en PBST . . . . .	142
4.63. Selectividad del inmunosensor de PR . . . . .	143
4.64. Determinación de PR en lisados celulares. . . . .	145
4.65. Expresión de PR por Western Blot . . . . .	146
4.66. Detección de PR en células intactas. . . . .	147
4.67. Inmunosensor para la detección simultánea de ER $\alpha$ y PR . . . . .	149
4.68. Detección multiplexada de ER $\alpha$ y PR . . . . .	150

# Índice de Tablas

2.1. Técnicas de detección de TNF $\alpha$ . . . . .	13
2.2. Técnicas de detección de ErbB2 . . . . .	15
4.1. Cuantificación de TNF $\alpha$ en suero . . . . .	64
4.2. Optimización de la detección de TNF $\alpha$ . . . . .	73
4.3. Comparativa de técnicas de detección de TNF $\alpha$ . . . . .	88
4.4. Optimización de la detección de ErbB2 . . . . .	111
4.5. Cuantificación de ErbB2 en suero . . . . .	114
4.6. Detección de ErbB2 en lisados celulares . . . . .	115
4.7. Detección de ErbB2 en célula entera . . . . .	119
4.8. Comparativa de técnicas de detección de ErbB2 . . . . .	123
4.9. Detección de ER $\alpha$ en lisados celulares . . . . .	134
4.10. Optimización de la detección de PR . . . . .	141
4.11. Detección de PR en lisados celulares . . . . .	145



# Abstract

At present the clinical diagnosis demands the implementation of methodologies of simple management, affordable cost, reduced response time and with multiplexing capabilities that can be implemented in the clinical routine for the determination of biomarkers of relevance in non-invasive samples such as liquid biopsies.

In response to these demands, this Doctoral Thesis has addressed the development of several **electroanalytical biosensing platforms applicable to the determination of inflammation biomarkers and breast cancer associated biomarkers**. The operation of most of these bioplatfroms is based on the realization of immunoreactions on the surface of commercial magnetic microparticles that are coupled in the final stage, after their complete modification, on disposable electrodes to perform the amperometric transduction, whose magnitude is proportional to the concentration of the biomarker under study.

We first present a **magnetoinmunosensor for the determination of  $\text{TNF}\alpha$** , a prominent inflammatory biomarker. After the optimization of the main experimental variables, this immunosensor has been used for the determination of  $\text{TNF}\alpha$  levels in human serum, obtaining an exceptional sensitivity, allowing the quantification of this biomarker in a range of clinically relevant concentrations for most inflammatory diseases related to alterations in the level of this biomarker. In order to maintain this high sensitivity when the determination is performed directly on scarcely diluted human serum samples, the composition of a solution that minimizes the matrix effect in this complex sample has been optimized. To demonstrate the practical applicability of this methodology, recovery studies have been performed on human serum samples. The simplicity and rapidity of the assay, together with its robustness and sensitivity, make the  $\text{TNF}\alpha$  magnetoinmunosensor developed a very attractive alternative to traditional conventional ELISA methods, especially for its future implementation in *Point-of-Care* devices. In addition, and in an effort to further simplify the measurement system, the development of a disposable microfluidic immunosensor is also presented for the determination of  $\text{TNF}\alpha$  by coupling an integrated immunosensor, using as support the same disposable electrodes, with a small microfluidic circuit, avoiding the use of magnetic particles as sup-



port for the immunoassay. This microfluidic immunochip, where the different steps of the immunoassay have been grouped in a single step, provides a lower sensitivity but a higher speed and a lower cost per analysis. Its suitability for applications where the latter features are pursued over the sensitivity has been demonstrated with the analysis of serum samples diluted to 25 %.

In addition, given the high incidence of breast cancer and the fact that it is now widely accepted that the early diagnosis of this type of cancer is a key factor in patient's survival and quality of life, the demand for efficient devices to help to improve reliability in diagnosis and prognosis has increased noticeably. To this end, **amperometric magnetoinmunosensor platforms have been developed for the determination of the three receptors that allow the classification of breast cancer in the established molecular subtypes: ErbB2, ER $\alpha$  and PR.** All the individual magnetoinmunosensors have demonstrated excellent analytical characteristics in a concentration range of clinical interest, applicability for the determination of circulating receptors in serum samples and the endogenous content of the receptors in cell lysate samples using an amount of lysate (2,5  $\mu$ g) much lower than the required by conventional techniques, together with the possibility of discriminating intact cancer cells depending on their extracellular receptor expression level. This latter application is of particular relevance because at present only a limited number of commercial ELISA tests are available for this purpose, besides the fact that they require additional stages of cellular fixation and permeabilization.

Taking into account the indisputable interest of the simultaneous determination of these receptors and in general of tumor biomarkers to improve the reliability in the diagnosis and prognosis of this disease, the possibility to transfer these individual biosensing bioplateforms to multiplexed platforms in an extremely simple way through the dual determination of ER $\alpha$  and PR on dual disposable electrodes, maintaining the analytical characteristics and practical applicability of the individual determinations, has been demonstrated. This possibility, together with the versatility of the designs, which makes them applicable for the determination of other relevant protein biomarkers, prior selection of specific antibodies and optimization of the bioassay formats, opens the **possibility of developing bioanalytical devices on demand for the individual or multiple determination of these biomarkers or others of relevance in cancer or other diseases, responding to a particularly important challenge in the current clinic.**

**In summary, the four platforms developed for the individual determination of biomarkers of clinical relevance (TNF $\alpha$ , ErbB2, ER $\alpha$  and PR) and the platform developed for the dual determination (ER $\alpha$  and PR), besides demonstrating excellent analytical characteristics, are easy to handle and provide results in accordance with those provided by conventional ELISA methodologies but in less time, with less cost and using easily miniaturized ins-**

---

**trumentation, characteristics that make them especially attractive for their implementation in easy to use and affordable devices, perfectly suited for routine, decentralized and minimally invasive determinations that facilitate the predictive diagnosis, therapeutic follow-up and prognosis of patients, with the undeniable benefits that this entails for patients and the healthcare system.**



# Resumen

En la actualidad, el diagnóstico clínico demanda la implementación de metodologías de manejo sencillo, coste asequible, reducido tiempo de respuesta y con capacidad de multiplexado que puedan implementarse en la rutina clínica para la determinación de biomarcadores de relevancia en muestras no invasivas, como biopsias líquidas.

En respuesta a estas demandas, en esta Tesis Doctoral se ha abordado el desarrollo de varias **plataformas biosensoras electroanalíticas aplicables a la determinación de biomarcadores de inflamación y asociados a cáncer de mama**. El funcionamiento de la mayoría de estas bioplataformas se basa en la realización de reacciones de inmunoreconocimiento sobre la superficie de micropartículas magnéticas comerciales. Tras su completa modificación, se acoplan sobre electrodos desechables para realizar la transducción amperométrica, cuya magnitud resulta proporcional a la concentración del biomarcador en estudio.

Se presenta en primer lugar un **magnetoinmunosensor para la determinación de TNF $\alpha$** , un destacado biomarcador inflamatorio. Tras la optimización de las principales variables experimentales, este inmunosensor se ha empleado para la determinación de los niveles de TNF $\alpha$  en suero humano, obteniendo una excepcional sensibilidad, lo que permite su cuantificación en un rango de concentraciones clínicamente relevantes para la mayoría de las enfermedades inflamatorias relacionadas con alteraciones en el nivel de este biomarcador. Con el fin de mantener esta elevada sensibilidad cuando la determinación se realiza directamente en muestras de suero humano escasamente diluidas, se ha optimizado la composición de una disolución que minimiza el efecto matriz en esta muestra compleja. Para demostrar la aplicabilidad práctica de esta metodología se han realizado estudios de recuperación en muestras de suero humano. La simplicidad y rapidez del ensayo, junto con su robustez y sensibilidad, hacen que el magnetoinmunosensor de TNF $\alpha$  desarrollado sea una alternativa muy atractiva a los métodos convencionales ELISA, especialmente para su futura implementación en dispositivos tipo *Point-of-Care*. Adicionalmente, y en un esfuerzo por simplificar todavía más el sistema de medida, se presenta el desarrollo de un **inmunosensor microfluídico desechable**, también **para**

**la determinación de TNF $\alpha$** , acoplando un inmunosensor integrado a un pequeño circuito microfluídico y empleando como base los mismos electrodos desechables, prescindiendo así de las partículas magnéticas como soporte para el inmunoensayo. Este immunochip microfluídico, en el que se han agrupado las diferentes etapas del inmunoensayo en un solo paso, proporciona una menor sensibilidad pero una mayor rapidez y un menor coste de análisis. Su idoneidad para aplicaciones en las que estas últimas características primen sobre la sensibilidad se ha demostrado mediante el análisis de muestras de suero diluidas al 25 %.

Debido a la elevada incidencia del cáncer de mama y a la amplia aceptación de que el diagnóstico temprano de este tipo de cáncer es un factor clave en la supervivencia y calidad de vida del paciente, la demanda de dispositivos eficientes que ayuden a mejorar la fiabilidad en su diagnóstico y pronóstico ha aumentado considerablemente. Con el fin de satisfacer esta demanda, se han desarrollado **plataformas magnetoinmunosensoras amperométricas para la determinación de los tres receptores que permiten la clasificación del cáncer de mama en los diferentes subtipos moleculares establecidos: ErbB2, ER $\alpha$  y PR**. Los magnetoinmunosensores para la determinación individual de estos receptores han demostrado excelentes características analíticas en los rangos clínicos de interés, así como aplicabilidad para la determinación en suero de los receptores circulantes y del contenido endógeno de los mismos en muestras de lisados celulares empleando una cantidad de lisado (2,5  $\mu$ g) muy inferior a la requerida por las técnicas convencionales, junto con la posibilidad de discriminar células cancerígenas intactas en función del nivel de expresión de los receptores extracelulares. Esta última aplicación resulta de especial relevancia porque en la actualidad solo se dispone de un número limitado de ensayos ELISA comerciales con esta finalidad, que además requieren de etapas adicionales de fijación y permeabilización celular.

Teniendo en cuenta además el interés indiscutible de la determinación simultánea de estos receptores, y en general de los biomarcadores tumorales, para mejorar la fiabilidad en el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad, se ha demostrado la posibilidad de trasladar de forma extremadamente sencilla estas bioplataformas de determinación individual a plataformas de multiplexado a través de la **determinación dual de ER $\alpha$  y PR** sobre electrodos desechables duales, manteniendo las características analíticas y la aplicabilidad práctica demostrada para las determinaciones individuales. Esta posibilidad, junto con la versatilidad de los diseños, que los hace aplicables a la determinación de otros biomarcadores proteicos de relevancia, previa selección de anticuerpos específicos y optimización del formato de ensayo, abre la **posibilidad de desarrollar dispositivos bioanalíticos a la carta para la determinación individual o múltiple de estos biomarcadores u otros de relevancia en cáncer o en otro tipo de enfermedades, respondiendo a un reto particularmente importante en la clínica actual**.

**En resumen, las cuatro plataformas desarrolladas para la determinación de biomarcadores de relevancia clínica de forma individual (TNF $\alpha$ , ErbB2, ER $\alpha$  y PR) y la plataforma desarrollada para la determinación dual (ER $\alpha$  y PR), además de demostrar excelentes características analíticas, resultan de fácil manejo y proporcionan resultados en concordancia con los proporcionados por las metodologías convencionales tipo ELISA pero en menos tiempo, con menor coste y empleando instrumentación fácilmente miniaturizable, características que las hacen especialmente atractivas para su implementación en dispositivos fáciles de usar y asequibles para realizar determinaciones de rutina, descentralizadas y de forma mínimamente invasiva, que faciliten el diagnóstico predictivo, el seguimiento terapéutico y el pronóstico de los pacientes, con los beneficios indiscutibles que esto supone para los pacientes y el sistema sanitario.**



# Capítulo 1

## Objetivos y plan de trabajo

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de plataformas inmuno-sensoras electroanalíticas para diagnóstico clínico, basadas en el empleo de Partículas Magnéticas (MBs) convenientemente funcionalizadas, formatos de ensayo tipo sándwich y transducción amperométrica sobre electrodos desechables.

En primer lugar, se ha implementado una plataforma inmuno-sensora para la determinación del Factor de Necrosis Tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), un importante biomarcador de inflamación. En la segunda etapa, se han desarrollado metodologías para mejorar el diagnóstico de cáncer de mama, a través de la determinación de los tres receptores proteicos en cuya expresión se basa actualmente la clasificación de esta enfermedad.

En todos estos desarrollos se ha buscado maximizar la sensibilidad y selectividad del sensor, prestando al mismo tiempo gran atención a la rapidez y coste de la detección. Estas características resultan imprescindibles en una herramienta de diagnóstico que pretende cumplir con los requisitos impuestos por un entorno clínico real.

En esta misma línea, también ha cobrado especial protagonismo la naturaleza de la muestra analizada: en el contexto de un test rápido, minimizar la preparativa de muestra es esencial. Por tanto, llevar a cabo la determinación directamente en muestras complejas es determinante a la hora de poder implementar estos desarrollos en un entorno clínico real. Para ello se ha demostrado la aplicabilidad de las metodologías desarrolladas al análisis de muestras de diversa naturaleza y complejidad, como el suero, lisados celulares e incluso células intactas.

Para lograr estos objetivos se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

- Desarrollo de la plataforma biosensora electroquímica.



- Comparación con otros métodos de determinación complementarios, como la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) o el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).
- Optimización de las principales variables experimentales.
- Caracterización del comportamiento analítico del sensor.
- Aplicación de la plataforma desarrollada al análisis de muestras complejas.
- Evaluación del rendimiento del sensor en función de los umbrales de cada biomarcador en muestras de interés.
- Detección simultánea de biomarcadores.

## Capítulo 2

# Introducción

El mundo del diagnóstico clínico está prestando gran atención a herramientas que puedan aplicarse en entornos descentralizados cerca del paciente. Estas herramientas, conocidas como dispositivos a pie de cama o dispositivos Point of Care (POC), permiten unos tiempos de respuesta terapéutica mucho menores, aumentando la eficiencia clínica, tanto desde el punto de vista médico como económico.

Las ventajas que ofrecen en cuanto a rapidez y comodidad son valoradas tanto desde el punto de vista del paciente, por el impacto que tiene en su salud, como desde el punto de vista del equipo médico, que ve facilitada su labor. Al mismo tiempo, el desarrollo de plataformas de sensado *in-situ* permite mejorar la eficiencia de programas de cribado, lo que se traduce en una menor tasa de hospitalización, una respuesta terapéutica más rápida y una enorme reducción de costes. Por otro lado, su utilidad en el diagnóstico precoz es indiscutible, con todas las ventajas que lleva asociadas la detección temprana de una patología. Aplicadas tanto a programas de cribado como de diagnóstico rápido, su objetivo final es la mejora de la evaluación, el tratamiento, y finalmente la tasa de supervivencia de los pacientes.

Estas herramientas de diagnóstico requieren de dos factores: Por un lado, la identificación de biomarcadores apropiados, biomoléculas cuya concentración se correlaciona unívocamente con el estado de la enfermedad. Por otro lado, técnicas de detección adecuadas, que además de sensibles y específicas han de poseer otros atributos, como la rapidez de la medida, bajo coste, simplicidad de uso, portabilidad, etc.

Pese al enorme progreso en el estudio e identificación de nuevos biomarcadores, su implementación como herramientas predictivas ha sido mucho más pausada. Un ejemplo de ello es el  $\text{TNF}\alpha$ , un biomarcador de inflamación perfectamente aceptado como objetivo del tratamiento de varias enfermedades

como la artritis reumatoide o la enfermedad de Chron, pero con un establecimiento mucho menor como herramienta de diagnóstico y seguimiento.

Otro ámbito de gran impacto es el del cáncer de mama, cuya incidencia en la población femenina hace de esta enfermedad un objetivo prioritario. Del estudio de varios biomarcadores (Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico 2 (ErbB2), Receptor de Estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ) y Receptor de Progesterona (PR)) se extrae una información esencial para realizar el pronóstico y guiar el tratamiento de los pacientes. Sin embargo, las técnicas de detección empleadas actualmente, limitan su implementación fuera del entorno hospitalario o por personal no especializado.

En este trabajo se ha desarrollado una plataforma sensora combinando el uso de MBs y una detección amperométrica sobre sustratos electrónicos desechables, un dúo que ha demostrado su utilidad en la cuantificación fiable de biomoléculas directamente en muestras complejas, de manera rápida, sencilla y a bajo coste. Sobre esta base, se ha construido un biosensor de  $TNF\alpha$ , con el objetivo de mejorar el diagnóstico de enfermedades inflamatorias, que al mismo tiempo permita guiar su tratamiento y realizar un seguimiento mucho más cercano de la evolución del paciente. Adicionalmente, se han desarrollado plataformas sensoras para la determinación fiable de los principales receptores proteicos asociados con el diagnóstico y pronóstico de cáncer de mama, con la correspondiente repercusión en el diagnóstico, clasificación, estrategia de tratamiento, seguimiento de la evolución y pronóstico de la enfermedad.

Complementariamente, se ha explorado la multidetección simultánea de varios biomarcadores. Muchos procesos biológicos pueden caracterizarse de manera más precisa a través del estudio de no uno, sino varios biomarcadores interrelacionados. En esta línea, se ha desarrollado un multisensor aplicado al campo del cáncer de mama.

Por último, es importante destacar la trascendencia del tipo de muestra analizada. En este trabajo se ha hecho un especial esfuerzo por llevar a cabo la detección de diferentes biomoléculas en muestras de creciente complejidad, como son el suero, lisados celulares e incluso células intactas. La idoneidad del sensor propuesto para trabajar con este tipo de muestras intensifica la relevancia de la solución propuesta.

## 2.1. Biomarcadores proteicos de relevancia clínica

Un **biomarcador** es un indicador medible de un estado biológico concreto, de una relevancia particular para conocer el riesgo de contracción, presencia o estado de una enfermedad. Entre sus distintos tipos, destacan los biomarcadores moleculares, los cuales pueden ser de una naturaleza muy variada (genética, proteica y metabólica). Sin embargo, el dominio de las proteínas es

probablemente el más afectado en la enfermedad y, por tanto, el campo de la proteómica ocupa un lugar privilegiado en el descubrimiento y estudio de biomarcadores (Rifai et al., 2006).

Las **proteínas** son macromoléculas compuestas de largas cadenas de aminoácidos, cuyas propiedades están determinadas en gran medida por sus diferentes niveles de estructura tridimensional (Voet y Voet, 2011). Esta complejidad estructural deriva en una enorme variedad de proteínas diferentes, con funciones muy diversas dentro del organismo: estructurales, enzimáticas, hormonales, de transporte, de almacenamiento, de defensa, etc. (Kim et al., 2014).

En el ámbito clínico, los biomarcadores pueden emplearse en pruebas de cribado o *screenings* para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades, así como para guiar terapias moleculares o evaluar la respuesta terapéutica (Etzioni et al., 2003). Al mismo tiempo, destacan por su utilidad en el diagnóstico precoz, que resulta de gran interés especialmente en enfermedades como el cáncer, cuya tasa de mortalidad, incidencia y coste de tratamiento está directamente relacionada con el estado de avance de la enfermedad. Teniendo esto en cuenta, el impacto que tiene el desarrollo de herramientas analíticas en este campo es enorme.

En este trabajo se ha desarrollado una plataforma de detección de biomarcadores muy versátil, que se ha aplicado a la detección de biomarcadores proteicos en dos ámbitos de la salud diferentes: enfermedades inflamatorias y cáncer de mama. Ambos son campos de gran interés que pueden beneficiarse de las ventajas que ofrece una misma tecnología subyacente.

### 2.1.1. Biomarcadores de inflamación

Cuando se produce una infección bacteriana en el organismo, la función del sistema inmune es controlar o erradicar esta infección. En función de la naturaleza de la misma, el sistema inmune entra en acción a través de diferentes mecanismos, que desencadenan una serie de reacciones que culminan con una migración de fagocitos al centro de la infección. Una vez allí, estos fagocitos son activados con el objetivo de que digieran las bacterias invasoras. En este proceso de activación se producen unas proteínas llamadas **citoquinas**, que tienen la función de transmitir el mensaje de que el organismo ha sido infectado, y activan otras células del sistema inmunitario. En definitiva, la respuesta inmunitaria inicial desemboca en una serie de reacciones inmunitarias adicionales. Este proceso se conoce como **cascada inflamatoria** y es una compleja estructura en la que los diferentes elementos del sistema inmunitario cooperan de manera intrincada.

Esta respuesta inmunitaria o inflamatoria, al mismo tiempo, es un proceso que acompaña a muchas patologías diferentes: desde artríticas (Karlson et al.,

2009) hasta tumorales (Ballaz y Mulshine, 2003; Allavena et al., 2008; Brenner et al., 2014), pasando por afecciones cardiovasculares (Armstrong et al., 2006). Por tanto, a través de la identificación y posterior cuantificación de diferentes biomoléculas que desempeñan funciones concretas dentro de la cascada inflamatoria, puede evaluarse el estado de una patología en concreto (Lundblad, 2011). Estas biomoléculas características son conocidas como **biomarcadores de inflamación**.

Dentro de la familia de los biomarcadores de inflamación, las citoquinas poseen un interés especial, ya que estas proteínas regulan la actividad de los leucocitos a través de diferentes mecanismos (Rankin, 2004; Feghali y Wright, 1997). En gran medida, dirigen la respuesta inflamatoria, siendo determinantes en los procesos de activación celular y de respuesta sistémica a la inflamación (Nathan, 2002). Al mismo tiempo, tienen un rol central en la red de interacciones que regulan varias células diana, promoviendo o inhibiendo estos procesos inflamatorios. Entre las citoquinas promotoras de la inflamación se encuentran la Interleuquina 1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ), la Interleuquina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), la Interleuquina 2 (IL2), la Interleuquina 6 (IL6), la Interleuquina 8 (IL8), la Interleuquina 12 (IL12), el Interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) o la TNF $\alpha$  y entre las citoquinas supresoras de la inflamación la Interleuquina 4 (IL4), la Interleuquina 5 (IL5), la Interleuquina 10 (IL10) o el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

Entre todas estas citoquinas, este trabajo se ha centrado en la detección de TNF $\alpha$ , por su protagonismo no solo en el diagnóstico, sino también en el tratamiento de enfermedades de alta relevancia como la artritis reumatoide o la enfermedad de Chron.

#### 2.1.1.1. TNF $\alpha$

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una citoquina promotora de la inflamación que secretan los macrófagos activados y tiene un rol relevante en varios procesos inflamatorios (Aggarwal, 2003). Esta proteína está presente en el suero como una molécula biológicamente activa bajo la forma de un homotrímero de un peso molecular de 55 kDa. Su concentración aumenta al activarse la cascada inflamatoria, lo que posiciona al TNF $\alpha$  como un importante indicador en varias patologías, como la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide y muchos otros procesos inflamatorios, incluyendo el cáncer (de Kossodo et al., 1995; Namas et al., 2009; Scully et al., 2010). Por tanto, la determinación de la concentración de TNF $\alpha$  en muestras reales resulta especialmente atractiva desde el punto de vista clínico.

Entre las diferentes posibles aplicaciones, pueden destacarse los casos de la artritis reumatoide o la enfermedad de Chron, en cuyo tratamiento se emplean medicamentos biológicos que inhiben el TNF $\alpha$  circulante. Este tratamiento con anticuerpos específicos antiTNF $\alpha$  (existen actualmente cinco fár-

macos basados en esta misma estrategia: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab Pegol y Golimumab) consigue reducir los síntomas de la enfermedad considerablemente (Martínez-Borra et al., 2002). Al mismo tiempo, de cara al seguimiento del tratamiento, Ordás et al. (2012) sugirieron que la cuantificación de los niveles de TNF $\alpha$  circulante puede resultar en una mejor adecuación de la dosis, con el objetivo de reducir costes en el tratamiento, evitando al mismo tiempo efectos secundarios indeseados.

También otros autores han descrito el interés de conocer la concentración en suero de esta proteína para el pronóstico y seguimiento del tratamiento por quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón avanzado (Derin et al., 2008).

### 2.1.2. Biomarcadores de cáncer de mama

Uno de los campos de la medicina que más interés suscita actualmente, por su incidencia, consecuencias e impacto en la sociedad, es el cáncer, y en concreto el cáncer de mama. El cáncer de mama es el más común a nivel mundial y, con gran diferencia, el más frecuente en mujeres, con un 25 % del total de los casos (1,67 millones de casos diagnosticados en 2012). Asimismo, tras el cáncer de pulmón, es el segundo mayor causante de muertes relacionadas con el cáncer (522.000 fallecimientos en el año 2012, un 15 % del total) (Ferlay et al., 2012). Con semejante incidencia, cualquier medida para mejorar el diagnóstico, tratamiento o seguimiento de la enfermedad resulta del máximo interés.

En este escenario, un diagnóstico preciso es esencial, y una herramienta que ha demostrado ser fructífera es el estudio de ciertos biomarcadores tumorales concretos, que aportan una información muy útil sobre la naturaleza del cáncer, su grado histológico, pronóstico y respuesta a diferentes tratamientos.

Diversos componentes biológicos como citoquinas, hormonas o neurotransmisores, al anclarse sobre receptores celulares específicos, actúan como mitógenos (factores que estimulan la división celular) en las células tumorales. Esta unión entre receptor y proteína activa diferentes vías de señalización intracelular que culminan con la transcripción de ciertos genes encargados de controlar diversas funciones celulares, como el ciclo celular, proliferación, apoptosis, etc. El análisis de estos factores permite obtener una información esencial tanto para prever la evolución clínica del paciente como para elegir el tratamiento más adecuado.

Es más, a través del análisis de varios de estos biomarcadores puede realizarse una clasificación del cáncer de mama por **subtipos moleculares** (Viale, 2012). A día de hoy, se analizan principalmente los siguientes biomarcadores: ErbB2, ER $\alpha$  y PR. El estudio de los niveles de expresión de estos biomarcadores

permite la clasificación de la enfermedad en cuatro grupos principales (Patris et al., 2014):

- Positivo en receptores hormonales (estrógeno o progesterona)
- Positivo en ErbB2
- Positivo en receptores hormonales y en ErbB2
- Negativo en receptores hormonales y en ErbB2

La determinación de los niveles de expresión de ErbB2, ER $\alpha$  y PR permite, de esta manera, la elección de terapias más adecuadas para cada tipo de cáncer de mama, lo que repercute directamente en los pacientes a través de un mejor tratamiento y pronóstico (Santillán-Benítez et al., 2013).

#### **2.1.2.1. ErbB2**

El Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico 2 (ErbB2), también conocido como HER2/neu o CD340, es una glicoproteína de 185 kDa que resulta ser un biomarcador clave en el diagnóstico del cáncer de mama, así como en su tratamiento. El ErbB2 está involucrado en vías de señalización celular, que pueden desembocar en la proliferación, crecimiento, apoptosis y diferenciación celular. Estos procesos son esenciales para la vida, pero su descontrol está muchas veces asociado a enfermedades, especialmente el cáncer. En cuanto a su utilidad en el ámbito clínico, por un lado, cumple un rol protagonista en la proliferación de las células tumorales, así como en su crecimiento maligno. Por otro lado, es el objetivo del tratamiento en terapias contra el cáncer de mama (Zhu et al., 2013c; Marques et al., 2014).

El ErbB2 se sobreexpresa en el 20–25 % de cánceres de mama invasivos y suele estar relacionado con un pronóstico negativo y una baja tasa de supervivencia (Patris et al., 2014). Aunque principalmente aparece asociado al cáncer de mama, su elevada expresión también se ha relacionado con otros tipos de cáncer, como el de ovario, estómago, páncreas y próstata (Al-Khafaji et al., 2012).

De cara al tratamiento, actualmente se aboga por administrar un anticuerpo monoclonal específico antiErbB2 (como fármaco, es conocido bajo el nombre de Trastuzumab) a los pacientes candidatos. Para que el tratamiento sea efectivo es imprescindible que el paciente exhiba un nivel anormalmente alto de ErbB2, ya que la estrategia subyacente consiste en bloquear este receptor, evitando que desencadene vías de comunicación intracelular que culminan con la proliferación y crecimiento descontrolado de las células tumorales (Al-Khafaji et al., 2012).

La proteína ErbB2 consta de tres dominios claramente diferenciados: una región extracelular, una sección transmembrana hidrofóbica y una zona intracelular con actividad tirosina quinasa. Por medio de metaloproteasas matriz que seccionan el dominio extracelular del ErbB2, puede producirse un aumento de la fosforilación de la región tirosina quinasa, lo cual finalmente se traduce en un aumento del nivel de señalización intracelular (Al-Khafaji et al., 2012). Es más, la región extracelular seccionada del ErbB2 puede encontrarse en el torrente sanguíneo, y ha sido satisfactoriamente relacionada con tipos de cáncer de mama ErbB2 positivos (Mahfoud et al., 2014). Asimismo, altas concentraciones de esta región extracelular del ErbB2 en suero han sido relacionadas con un pronóstico negativo, una peor respuesta terapéutica y tasas de supervivencia más bajas en pacientes con cánceres de mama agresivos (Al-Khafaji et al., 2012). En este sentido, la FDA<sup>1</sup> ha definido un valor de corte de 15 ng/mL para este biomarcador en suero (Carney et al., 2013).

En esta misma línea, varios autores como Liu et al. (2013) y Al-Khafaji et al. (2012) destacan la importancia de poder determinar el nivel de expresión en **células tumorales circulantes** como herramienta de diagnóstico y evaluación de la respuesta ante terapias dirigidas.

#### 2.1.2.2. ER $\alpha$

El estrógeno es una hormona que juega un papel muy importante durante el desarrollo de la glándula mamaria, pero también en el desarrollo, riesgo y tratamiento del cáncer de mama. Interviene en su avance al anclarse y activar los diferentes receptores de estrógeno (ambas isoformas, ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) en la membrana celular y el citoplasma, produciendo una translocación hacia el núcleo celular, donde el ER $\alpha$  y el ER $\beta$  funcionan como factores de transcripción, regulando ciertos genes específicos (Katchy y Williams, 2014). De entre las dos isoformas diferentes, la única detectable por Inmunohistoquímica (IHC) en biopsias de cáncer de mama es la ER $\alpha$ , el subtipo sobreexpresado predominantemente en tejidos tumorales.

Existen numerosas evidencias de la importancia que tienen los receptores hormonales y en concreto el ER $\alpha$  en el desarrollo y proceso invasivo de las células de cáncer de mama (Zhu et al., 2013a), que resulta especialmente importante teniendo en cuenta que aproximadamente el 70 % de los cánceres de mama diagnosticados se clasifican como ER $\alpha$  positivos (Felzen et al., 2015). Es más, estudios recientes sugieren que este factor de transcripción juega un papel esencial en la biología del cáncer de mama, regulando su proliferación (Zhu et al., 2013a). Al mismo tiempo, los niveles de ER $\alpha$  en muestras de tejido

---

<sup>1</sup> Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos). Es la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos.



de cáncer de mama son muy buenos indicadores de la respuesta previsible del paciente ante una terapia hormonal (Cormier et al., 1989).

A pesar de la importancia de este biomarcador, no es habitual determinar el nivel de expresión de ER $\alpha$  en tejidos de mama sanos, es decir, que no hayan desarrollado algún carcinoma. Por otro lado, los niveles y distribución están fuertemente influidas por factores como la edad, menopausia, etc. y por tanto no existen rangos de referencia bien documentados (Sell, 2003). En cualquier caso, algunos estudios apuntan a valores cercanos a los 10 fmol/mg de extracto de proteína (a través de ensayos de unión receptor-ligando) y a los 15 fmol/mg de extracto de proteína (por medio de inmunoensayos enzimáticos) como umbrales a la hora de discernir entre tejidos con y sin sobreexpresión de ER $\alpha$  (Krambovitis et al., 1995).

Respecto a las concentraciones de ER $\alpha$  en suero, aún no se han establecido claros valores umbral para discriminar pacientes en función de su nivel de expresión de este receptor o su valor en el pronóstico. Sin embargo, Widschwendter et al. (2009), en un estudio con 182 pacientes con cáncer de mama y 188 pacientes sanos como control, asociaron la bioactividad de ER $\alpha$  en suero con la presencia de cáncer de mama: las mujeres con concentraciones mayores a 42,1 pg/mL de ER $\alpha$  en suero muestran un riesgo 2,47 veces mayor de sufrir cáncer de mama y 2,70 veces mayor de que este sea ER $\alpha$  positivo.

En cualquier caso, el ER $\alpha$  está considerado como el biomarcador de mayor utilidad y el que mayor información útil proporciona para ayudar en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama. Por tanto, el desarrollo de nuevas herramientas de determinación de ER $\alpha$ , junto con otros biomarcadores asociados, revertiría en beneficio de los pacientes de cáncer de mama, mejorando en primer lugar el diagnóstico de la enfermedad, permitiendo su estratificación en grupos de riesgo definidos, para su posterior tratamiento guiado y personalizado (Patani et al., 2013).

### 2.1.2.3. PR

El Receptor de Progesterona (PR) es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de los receptores nucleares. Estos últimos actúan junto con otros factores de transcripción para regular la expresión de conjuntos de genes involucrados en la regulación del crecimiento y desarrollo celular, apoptosis, homeostasis, inflamación, metabolismos lipídicos, ciclos reproductivos y otros procesos biológicos fundamentales.

La cuantificación del nivel de expresión de PR es determinante en el pronóstico y previsión de la evolución de una terapia endocrina en pacientes con cáncer de mama o útero. Dada la importancia de este receptor en los diferentes

procesos celulares, resulta del mayor interés determinar la cantidad de PR en diferentes tipos de célula y tejidos.

Hace tiempo que se estudia la relación que tiene la progesterona, junto con los estrógenos, con el cáncer de mama. El más amplio entendimiento que se tiene hoy en día de las funciones de estas hormonas ha permitido relacionarlas con sus receptores específicos (PR y ER $\alpha$ ) en las células (Wiebe et al., 2013). Cabe destacar el valor del dúo ER $\alpha$ –PR en la predicción de la sensibilidad a terapias endocrinas (Cormier et al., 1989; Fuqua y Cui, 2004; Martin et al., 2004b), demostrando que los tumores clasificados como ER $\alpha$  positivos y PR negativos responden peor a una terapia endocrina que tumores positivos en ambos receptores (Kim et al., 2006). Asimismo, la carencia de una sobreexpresión en PR o ER $\alpha$  está relacionada con un pronóstico más negativo y habitualmente viene acompañada de un menor intervalo libre de enfermedad y una mayor mortalidad (Cormier et al., 1989).

Teniendo en cuenta el importante papel que desempeña el PR en el resultado clínico final, este biomarcador (habitualmente en conjunción con el ER $\alpha$ ) es ampliamente empleado para guiar el tratamiento del paciente de cáncer de mama. Estudios recientes han demostrado, además, cómo el PR funciona como una especie de reostato molecular, controlando la actividad transcripcional del ER $\alpha$ , con tremendas implicaciones en el pronóstico y plan terapéutico del paciente. De hecho, en cánceres clasificados como ER $\alpha$  positivos, la expresión positiva de PR se emplea como indicador de un pronóstico más favorable (Mohammed et al., 2015).

Todos estos avances destacan, por un lado, la importancia que tienen estos biomarcadores individualmente, pero al mismo tiempo, dejan patente la interrelación existente entre ambos. Por tanto, la determinación simultánea de ambos receptores, PR y ER $\alpha$ , puede conducir a un diagnóstico más preciso, en ocasiones decisivo a la hora de determinar la estrategia de tratamiento óptima para cada paciente.

## **2.2. Técnicas convencionales para determinación de marcadores clínicos de naturaleza proteica**

Dado el interés clínico de los biomarcadores expuestos, la detección de los mismos ha sido abordada anteriormente, desde distintos puntos de vista. A continuación se presentan, por un lado, las técnicas más convencionales, las más empleadas en determinaciones rutinarias y las más arraigadas en la práctica clínica. Por otro lado, se destacan algunos de los desarrollos científicos más destacables encontrados en la literatura, con el objetivo de resaltar las deficiencias que presentan los métodos más tradicionales.

### 2.2.1. Técnicas para la detección de TNF $\alpha$

Las concentraciones normales de TNF $\alpha$  circulante están en niveles de pg/mL (de Kossodo et al., 1995) y por tanto su detección requiere de un sensor extremadamente sensible. Actualmente, el método de detección de referencia es el ELISA, que requiere de una cantidad de muestra y reactivos elevada, un equipamiento costoso, largos tiempos de ensayo y personal especializado, además de ser difícil de automatizar y miniaturizar, lo que limita su uso para realizar análisis descentralizados rutinarios o *in situ*.

Como resultado, el uso del TNF $\alpha$  como biomarcador no está extendido en el ámbito clínico, aunque su aplicación en áreas de investigación es relativamente común y arroja interesantes resultados. Con el objetivo de superar estas limitaciones, se han desarrollado varios biosensores y ensayos, basados en diferentes técnicas de detección de TNF $\alpha$ , entre otras, acústicas (Bahk et al., 2011), ópticas (Law et al., 2011), capacitivas (Qureshi et al., 2010) o electroquímicas (Mazloum-Ardakani et al., 2014).

En cualquier caso, y a pesar de las buenas sensibilidades obtenidas a través de varios de los sensores recogidos en la Tabla 2.1, la complejidad inherente de los métodos empleados impide su aplicación en un entorno clínico real, tal y como se discutirá en la Sección 4.1.2.3.

Metodología	Técnica	Muestra	Rango de concentraciones (pg/mL)	LD (pg/mL)	Tiempo de ensayo	Referencia
Amplificación con AuNPs	SPR	Suero humano al 25 %	50–300	54.4	20 min	Martinez-Perdiguero et al. (2014b)
Quimioluminiscencia mejorada	ECL	Suero bovino al 50 %	9–312	1	≈ 15 h	Luo et al. (2005b)
Aptameros marcados con azul de metileno	EQ (SWV)	Sangre humana	10000–100000	10000	≈ 1 h	Liu et al. (2013)
Nanohilos de péptidos autoensamblados modificados con ferroceno y Nanopilares de oro funcionalizados con glucosa oxidasa	SPR	Suero humano	10–10000	2	≈ 3 h	Sun et al. (2013)
Sin marcado ( <i>label-free</i> )	EIS	Medio de cultivo	1–100	1	≈ 3 h	Pui et al. (2013)
Sin marcado ( <i>label-free</i> )	EQ (CV)	Suero humano	20–34000	10	≈ 5 h	Weng et al. (2013a)
Nanopartículas de óxido de cerio	EQ (CA)	Suero humano	5–5000	2	≈ 4 h	Li et al. (2012a)
MBs	EQ (DPV)	Suero	100–5000	44	≈ 6 h	Bettazzi et al. (2012)
Nanoesferas funcionalizadas con AP	EQ	Suero humano al 25 %	20–200000	10	≈ 3 h	Yin et al. (2011)

**Tabla 2.1:** Comparativa de diferentes métodos de detección de TNF $\alpha$ .

### 2.2.2. Técnicas para la detección de biomarcadores de cáncer de mama

Actualmente, las dos técnicas principales de análisis de biomarcadores tumorales relacionados con el cáncer de mama son la tinción de los receptores celulares por medio de la IHC y el marcado fluorescente de los genes que determinan el nivel de expresión de estos receptores por medio de Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH).

Estas dos técnicas, complejas por sí mismas, incluyen etapas que conllevan mucho tiempo, necesitan de personal cualificado y requieren de una preparación de muestra muy laboriosa. Al mismo tiempo, el resultado de la determinación es semicuantitativo, separando los pacientes entre positivos y negativos en el biomarcador en cuestión (Al-Khafaji et al., 2012; Marques et al., 2014) y en muchas ocasiones puede desembocar en errores de evaluación. Existen otras técnicas, menos habituales, para medir el nivel de estos biomarcadores, como el Western Blot, Ensayo de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA), Ensayos de Unión a Ligando (LBA), genoensayos o la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR) (de Cremoux et al., 2003), pero todas ellas conllevan procesos largos y laboriosos, no compatibles con aplicaciones de alto rendimiento o producción.

Como ejemplo ilustrativo se puede tomar el caso del ErbB2, en el que aproximadamente un 20 % (~ 2,5 millones de casos en todo el mundo) de los pacientes clasificados como ErbB2 negativos han podido ser incorrectamente diagnosticados con respecto a este biomarcador, pudiendo desembocar en un cáncer de mama ErbB2 positivo recurrente. Resultados obtenidos en numerosos estudios clínicos con miles de pacientes han demostrado que la evaluación del nivel de ErbB2 en suero puede ser complementario a los tests IHC y FISH (Carney et al., 2013). Asimismo, poder determinar la concentración de ErbB2 en suero es especialmente útil en la fase de seguimiento de la enfermedad, resultando un método eficaz para monitorizar pacientes clasificados como ErbB2 positivos pero también para identificar aquellos pacientes inicialmente clasificados como ErbB2 negativos erróneamente.

#### 2.2.2.1. Técnicas para la detección de ErbB2

Más allá de las técnicas más convencionales de detección de ErbB2, han surgido varios trabajos de investigación en los que se ha abordado la cuantificación de este biomarcador desde diferentes puntos de vista. En la Tabla 2.2 se recogen los principales sensores electroquímicos desarrollados hasta la fecha. Así mismo, en la Sección 4.2.2.1 se discuten más en profundidad, en relación con el sensor de ErbB2 propuesto en este trabajo.

Metodología	Técnica	Muestra	Rango de concentraciones	Sensibilidad	LD (pg/mL)	Tiempo de ensayo	Referencia
Inmunosensor tipo <i>sándwich</i> nanoestructurado sobre conjuntos nanoestructurados preparados sobre membranas de policarbonato	CV	Lisados celulares y lisados tumorales	–	–	40 ng/mL	7 h 10 min	Mucelli et al. (2008)
Magnetoimmunoensayo tipo <i>sándwich</i> sobre MBs con Proteína A y marcado con AP	DPV	Suero	6–15 ng/mL	$9 \times 10^{-8}$ A mL/ng	6 ng/mL	130 min	Al-Khafaji et al. (2012)
Inmunosensor construido inmovilizando covalentemente antiErbB2 sobre una capa de nanocomposite (2,5-bis(tienil)-1 H-pirrol-(ácido p-benzóico)) sobre AuNPs combinado con AuNPs conjugadas con hidracina y aptámeros	SWSV	Suero y células de cáncer de mama	0,1 pg/mL–100 ng/mL	1.12 $\mu$ A mL/ng	0,037 pg/mL	≈18 h + 54 h (preparación)	Zhu et al. (2013c)
Immunoensayo tipo <i>sándwich</i> sobre electrodos serigrafiados de oro modificados con AuNPs	LSV	Suero	15–100 ng/mL	33,56 $\mu$ A mL/ng	4,4 ng/mL	2 h 50 min	Marques et al. (2014)
Inmunosensor <i>label-free</i> empleando electrodos de oro modificados con nanopartículas de óxido de hierro cubiertas de antiErbB2	DPV	Suero	0,01–10 ng/mL y 10–100 ng/mL	5.921 mA mL/ng	0,995 pg/mL	≈44 h	Emami et al. (2014)
Immunoensayo tipo <i>sándwich</i> sobre electrodos serigrafiados y basado en el uso de <i>nanobodies</i>	CA	Lisados celulares contaminados	1–200 $\mu$ g/mL	–	1 $\mu$ g/mL	≈3 h	Patris et al. (2014)

**Tabla 2.2:** Comparativa de diferentes inmunosensores electroquímicos para la detección de ErbB2

### 2.2.2.2. Técnicas para la detección de ER $\alpha$

A pesar de los argumentos anteriormente expuestos, no ha habido muchos desarrollos de biosensores electroquímicos aplicados a la detección de ER $\alpha$ . En la única referencia encontrada, Zhu et al. (2013a) realizaron un biosensor electroquímico de ADN capaz de interrogar el nivel de ER $\alpha$  en extractos nucleares de diferentes líneas celulares de cáncer de mama. La unión del ER $\alpha$  a los sitios de reconocimiento de la secuencia de ADN impide su digestión por parte de la Exonucleasa III, permitiendo la cuantificación final de ER $\alpha$  en un rango de 0,5–100 nM y obteniendo un Límite de Detección (LD) de 0,38 nM (25,1 ng/mL). Esta aproximación, sin embargo, requiere de un largo tiempo de preparación y el tiempo total de ensayo es de 19 h (Zhu et al., 2013a,b).

### 2.2.2.3. Técnicas para la detección de PR

En el momento de escritura de este trabajo, no se ha encontrado ninguna referencia a otro sensor electroquímico para la detección de PR.

## 2.3. Biosensores electroquímicos en análisis clínico

Un **sensor** es un dispositivo que registra un cambio físico, químico o biológico y lo convierte en una señal medible (Eggins, 2003). Para ello, un sensor cuenta con un **elemento de reconocimiento** que permite identificar de manera selectiva uno o varios analitos en particular y un **elemento transductor**, que produce una señal medible al producirse el evento de reconocimiento.

Un **biosensor electroquímico**, por tanto, es un sensor que combina un elemento de reconocimiento biológico con un transductor electroquímico.

En un biosensor, el elemento de reconocimiento biológico puede aparecer bajo diversas formas: enzimas, proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células, tejidos, receptores, etc. Este elemento reacciona selectivamente con el analito y produce una señal relacionada con la concentración del analito. En función de la naturaleza de este evento de reconocimiento biológico, los biosensores electroquímicos pueden clasificarse en dos familias (Ronkainen et al., 2010):

**Sensores biocatalíticos** El elemento de reconocimiento biológico es una enzima que reconoce el analito y produce una especie electroactiva medible.

**Sensores de afinidad** El elemento de reconocimiento es una biomolécula (anticuerpos, receptores, oligonucleótidos...) que se une fuertemente al analito, gracias a la complementariedad en tamaño, forma, etc. existente entre ambos.

Muchos analitos de interés no son candidatos para su detección por medio de sensores biocatalíticos, simplemente por que no existen enzimas suficientemente selectivas como para llevar a cabo la detección de un analito particular. Es en estos casos cuando los biosensores de afinidad resultan especialmente útiles (Bartlett, 2008).

El biosensor propuesto en este trabajo emplea un reacción enzimática, a través de la Peroxidasa de rábano (HRP), para obtener una respuesta electroquímica medible. Sin embargo, el núcleo de la reacción de reconocimiento reside en un reacción antígeno-anticuerpo, y por tanto se considerará que pertenece a la familia de los sensores de afinidad.

### 2.3.1. Inmunosensores

Un **inmunosensor** es un sensor de afinidad en el que la detección de un analito (antígeno) se produce a través de la reacción de reconocimiento específica **antígeno-anticuerpo**, en la que el analito se une a una región concreta del anticuerpo (Wang, 2006).

La región complementaria del anticuerpo se une al analito con gran afinidad y especificidad, características esenciales en un biosensor. A estas ventajas hay que sumarle el hecho de que se pueden producir anticuerpos contra una variedad amplísima de analitos de diferentes naturalezas: bacterias, virus, proteínas, fármacos y muchas otras sustancias químicas. En principio, si se puede crear un anticuerpo que específicamente reconozca un analito concreto, se puede construir un biosensor para detectarlo.

Por tanto, los inmunosensores presentan una gran versatilidad como herramienta de biodetección.

#### 2.3.1.1. Anticuerpos

Los **anticuerpos** son proteínas producidas por células B y son empleados por el sistema inmune para identificar sustancias extrañas como bacterias o virus. Se unen específicamente a una región única de su molécula objetivo (antígeno), conocida como epítipo.

La estructura básica de un anticuerpo consta de dos regiones: una región constante (Fc) y una región variable (Fab). Dentro de esta segunda se encuentra la zona más característica del anticuerpo, la región de reconocimiento o parátipo, una pequeña región de tan solo 5 a 10 aminoácidos que es la encargada de unirse específicamente al antígeno y a su epítipo concretamente.

Tal y como se ha adelantado, es posible crear anticuerpos sintéticos para que reaccionen específicamente con un analito particular. Estos anticuerpos,



en función de su interacción con el antígeno, se clasifican entre monoclonales y policlonales. Los anticuerpos monoclonales (mAb) se producen en células idénticas (clones procedentes de una sola célula B) y todos los anticuerpos poseen la misma especificidad, es decir, todos reconocen un solo epítopo del antígeno. Los anticuerpos policlonales (pAb), por el contrario, aunque se crean contra un mismo antígeno, se producen en distintas células B y, por tanto, existe cierta variabilidad en la especificidad de los mismos, es decir, reconocen distintos epítopos de un mismo antígeno (una mezcla de anticuerpos monoclonales).

### 2.3.2. Detección electroquímica

El sistema de transducción empleado en el desarrollo central de este trabajo ha sido electroquímico (en contraste con el sistema óptico del sensor de SPR utilizado como herramienta de apoyo en la detección de ErbB2). La detección electroquímica destaca por encima de otros métodos principalmente por su sensibilidad, simplicidad, bajo coste y portabilidad. Además, no necesita una preparativa compleja de la muestra y requiere muy pequeñas cantidades de la misma (Ronkainen-Matsuno et al., 2002).

Puede realizarse una primera clasificación de las técnicas de detección electroquímicas en función de si la reacción de interés genera una corriente (amperometría), un potencial (potenciometría) o altera las propiedades conductoras del medio (conductometría) entre electrodos, aunque también podrían añadirse sensores impedimétricos y de efecto de campo (Grieshaber et al., 2008).

En este trabajo, se ha seleccionado la **amperometría** como técnica de detección central, en la que se monitoriza de forma continua la corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva en una reacción bioquímica bajo un potencial constante (Eggins, 2003). Esta, será típicamente la reacción redox que cataliza la enzima HRP, empleada para "marcar" la reacción antígeno-anticuerpo que no produce ninguna especie electroactiva por sí misma (se trata por tanto de una transducción indirecta).

#### 2.3.2.1. Empleo de MBs

Las Partículas Magnéticas (MBs) empleadas (Dynabeads), son micropartículas monodispersas superparamagnéticas compuestas de una matriz de poliestireno con nanopartículas de maghemita<sup>2</sup>. Las partículas, de forma esférica y tamaño uniforme (las empleadas en este trabajo tienen un diámetro de 2,8  $\mu\text{m}$ ) pueden ser superficialmente modificadas con una amplia variedad de moléculas. Esta tecnología ha sido empleada en la separación o aislamiento de

---

<sup>2</sup> mineral ferrimagnético perteneciente a la familia de los óxidos de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )

material biológico, como células, microorganismos, proteínas o ácidos nucleicos.

Las propiedades superparamagnéticas de las partículas, es decir que solo son magnéticas en presencia de un campo magnético, hace que sean muy fáciles de resuspender cuando se elimina el campo magnético. Inmovilizando anticuerpos específicos sobre la superficie de las MBs, pueden capturarse y aislarse proteínas o células directamente en una suspensión compleja como la sangre, siguiendo la metodología descrita en la Sección 3.3.1.

Las MBs son una potentísima herramienta de análisis, de gran versatilidad y empleada en varias aplicaciones analíticas diferentes, incluyendo la detección electroquímica de biomoléculas (Palecek y Fojta, 2007). Mediante su funcionalización específica (con anticuerpos, por ejemplo) se facilita la captura eficiente del analito y permite su concentración, reduciendo al mismo tiempo la duración de la determinación. Por otro lado, se pueden aplicar de manera directa en procedimientos analíticos con una mayor velocidad de procesamiento de muestra o nivel de automatización (Chen et al., 2007).

A través de las MBs se consigue minimizar el efecto matriz, ya que permite encadenar diversas etapas de lavado y separación magnética, lo cual repercute directamente en la eficiencia de la determinación, especialmente en muestras complejas. Por otro lado, en comparación con otras técnicas basadas en superficie, se consigue aumentar enormemente la superficie activa de sensado, permitiendo la captura de mayor cantidad de analito. Al mismo tiempo, al estar las MBs en suspensión, dispersas en todo el volumen de muestra, se reduce drásticamente la distancia de migración de la molécula problema, minimizando limitaciones relacionadas con la difusión del analito hacia la superficie de sensado, lo cual se traduce en unas cinéticas más rápidas (Centi et al., 2007). Todas estas cualidades afectan directamente a las propiedades analíticas del sensor, tanto desde el punto de vista de sensibilidad y especificidad como de rapidez de medida.

Por todo ello, las MBs han demostrado ser una potente herramienta que ha permitido una mejora considerable en el comportamiento analítico de biosensores electroquímicos en diversos campos (Yáñez Sedeño et al., 2016).

### 2.3.3. Solución propuesta

En el escenario descrito, resulta indiscutible la necesidad de desarrollar un sistema de detección de biomarcadores rápido, simple y de bajo coste (Zhu et al., 2013c). Una evaluación precoz y fiable del nivel de expresión de importantes biomarcadores, permitiría una clasificación inequívoca de los pacientes que dirija su posterior tratamiento y seguimiento. El impacto que podría tener este desarrollo sería muy significativo, afectando no solo a la tasa de su-

pervivencia si no también ahorrando importantes costes en tiempo y dinero al realizar un pronóstico más fiable (Emami et al., 2014).

Teniendo esto en cuenta, los biosensores electroquímicos representan una clara alternativa a métodos más convencionales empleados actualmente, entre otras razones por su simplicidad de uso y alta sensibilidad. Es más, son capaces de ofrecer resultados cuantitativos fiables y precisos empleando una instrumentación de bajo coste y reducidas dimensiones, lo cual posiciona a esta técnica en un lugar preferente para poder ser integrada en un dispositivo POC, permitiendo su utilización en la práctica clínica diaria, en contraste con su uso para fines exclusivos de investigación (Al-Khafaji et al., 2012; Marques et al., 2014).

Una plataforma de sensado precisa y robusta puede completarse dotándola de otras cualidades, como el bajo coste por ensayo o que sea desechable, igualmente interesantes desde el punto de vista del usuario final. Un sensor de estas características sería muy bien recibido en un amplio espectro de aplicaciones analíticas, desde el diagnóstico clínico (Nahavandi et al., 2014) hasta el sector agroalimentario (Yoon y Kim, 2012), pasando por aplicaciones medioambientales (Jang et al., 2011).

Entre los diferentes métodos de cuantificación de proteínas existentes, las técnicas electroquímicas destacan especialmente por su equilibrio entre unas propiedades analíticas excelentes y otras características de un alto interés práctico, como son la rapidez de la medida, el bajo coste, la posibilidad de multiplexado y la capacidad de integración en un sistema miniaturizado y portable (Rusling, 2013).

En contraposición con el extendido uso de otro tipo de electrodos, la utilización de Electrodo desechable de Carbono para determinación individual (SPCE) resulta especialmente interesante desde el punto de vista de la aplicabilidad del sensor, teniendo en cuenta las posibilidades de producción en masa que ofrece la fabricación por serigrafía, obteniendo unos electrodos altamente reproducibles a un coste muy bajo (Fanjul-Bolado et al., 2008).

Finalmente, la combinación de la parte sensora con un sistema microfluídico puede resultar de interés, porque permitiría el control preciso de pequeños volúmenes de muestra y reactivos, así como la integración y automatización de las diferentes etapas de la preparativa necesarias. En esta misma línea, el empleo de microfluídicas poliméricas desechables y de bajo coste evitaría tener que usar protocolos de limpieza y desinfección del sistema entre medidas, eliminado cualquier problema de contaminación cruzada entre distintas medidas, un aspecto de gran importancia a la hora de la validación y la estandarización.

En este escenario resulta necesario redoblar los esfuerzos para reducir la complejidad inherente de los ensayos, que como se ha visto en muchas oca-

siones incluyen protocolos largos y laboriosos, requieren de instrumentación excesivamente costosa, etc. Como resultado, el desarrollo de una plataforma de detección de biomarcadores flexible, rápida, simple y al mismo tiempo sensible resulta del máximo interés desde el punto de vista clínico y de la investigación, siendo este el objetivo principal de este trabajo.



## Capítulo 3

# Parte experimental

Este capítulo recoge la instrumentación y protocolos más importantes utilizados en este trabajo, junto con una relación de los reactivos empleados, así como la base teórica de todos los cálculos realizados. Estos apartados serán referenciados en capítulos posteriores, con lo que la lectura de este capítulo puede realizarse, si se desea y resulta necesario, a través de las referencias posteriores.

### 3.1. Instrumentación

En esta sección se describe toda la instrumentación empleada en los diferentes ensayos realizados. Fundamentalmente, la biodetección se ha basado en técnicas electroquímicas, complementada principalmente con medidas de SPR. Consecuentemente, estas dos técnicas son descritas con especial detalle en este apartado.

#### 3.1.1. Medidas electroquímicas

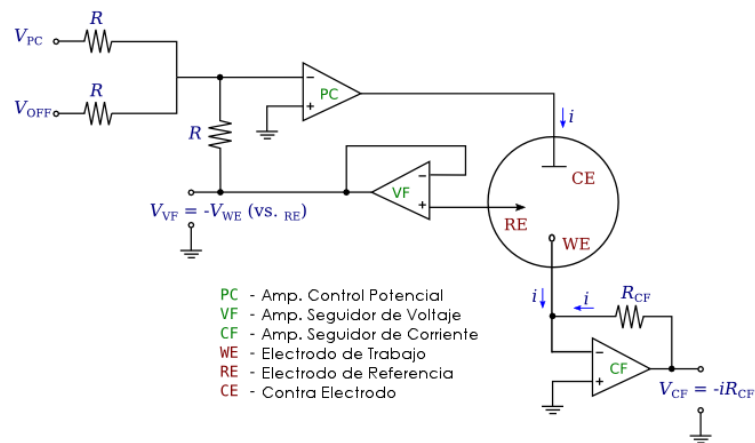
Para todas las medidas electroquímicas se ha empleado el bipotenciostato/galvanostato  $\mu$ STAT 400 de Dropsens (Figura 3.1), controlado mediante el software Dropview 8400 versión 2.1.

##### 3.1.1.1. Técnicas electroquímicas principales

La configuración elegida ha sido la de 3 electrodos (Electrodo de Trabajo (WE), Electrodo de Referencia (RE) y Electrodo Auxiliar o Contraelectrodo (CE)), en la cual el potenciostato mantiene un voltaje predeterminado entre el



**Figura 3.1:** Bipotenciostato/galvanostato  $\mu$ STAT 400 de Dropsens.



**Figura 3.2:** Circuito electrónico esquemático del potenciostato.



(a) Electrodo DRP-C110.



(b) Electrodo dual DRP-C110.

**Figura 3.3:** Tipos de electrodos empleados de Dropsens.

WE y el RE, encauzando la corriente a través del CE (ver Figura 3.2). Esta configuración permite realizar multitud de ensayos diferentes, basados en la aplicación de un voltaje y la medición de una corriente (modo potenciostato) o viceversa (modo galvanostato), de los cuales se han empleado principalmente dos:

### Amperometría

Se aplica un potencial constante y se registra la corriente de forma continua, monitorizando la reacción redox. En todos los ensayos se ha aplicado un potencial de -200 mV (respecto al electrodo de pseudoreferencia de Ag).

### DPV

Se aplican una serie de pulsos de voltaje regulares, superpuestos a un barrido lineal de potencial. Los parámetros empleados en las medidas de Voltamperometría Diferencial de Impulsos (DPV) han sido las siguientes:

Amplitud de pulso:	70 mV
Periodo:	100 ms
Escalón:	5 mV
Rango:	0 – 600 mV
Velocidad de barrido:	10 mV/s

#### 3.1.1.2. Electrodos

En todas las determinaciones electroquímicas se han empleado electrodos serigrafiados de carbono de Dropsens:



- Para las medidas simples, se han utilizado los electrodos DRP-C110 de Dropsens (Figura 3.3a), constituidos por un electrodo de trabajo de carbono de 4 mm de diámetro, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de Ag. Estos electrodos desechables están fabricados sobre un sustrato cerámico de  $33 \times 10 \times 0,5$  mm.
- Para las medidas de multideterminación se han empleado los electrodos serigrafiados duales DRP-C1110 de Dropsens (Figura 3.3b), compuestos por dos electrodos de trabajo de carbono elípticos de  $6,3 \text{ mm}^2$  de superficie, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de Ag. Estos electrodos, también desechables, están fabricados sobre el mismo sustrato que los DRP-C110.

Los electrodos se han conectado al potencióstato por medio de conectores específicos de Dropsens: el DRP-CAST para los simples y el DRP-BICAST para los duales.

### 3.1.2. Equipo SPR

Para las medidas de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) se ha utilizado un equipo SPR2 de Sierra Sensors GmbH (Figura 3.4), dotado de un sistema microfluídico y una unidad de procesamiento automático de muestras. Así mismo, se han utilizado chips sensores de oro de Sierra Sensors (Figura 3.5).

Al introducir el chip sensor en el equipo, este sella una celda microfluídica de 50 nL de volumen sobre la superficie del chip por el cual se hacen pasar los diferentes reactivos. El sistema funciona en modo de *flujo continuo*, con lo que siempre existe circulación de algún reactivo (o *buffer*) sobre el chip. Aprovechando fenómenos hidrodinámicos, este instrumento es capaz de dirigir los reactivos a dos espacios diferenciados de la celda, con lo que se dispone de dos zonas de sensado independientes (llamadas *spots*) para realizar ensayos en paralelo (ver Figura 3.6).

Todo ello se complementa con un sistema automático de procesamiento de muestras, que mediante un carrusel que alberga hasta 47 viales distintos, permite crear complejos ensayos que se ejecutan de manera desatendida.

#### 3.1.2.1. Principio de funcionamiento del SPR

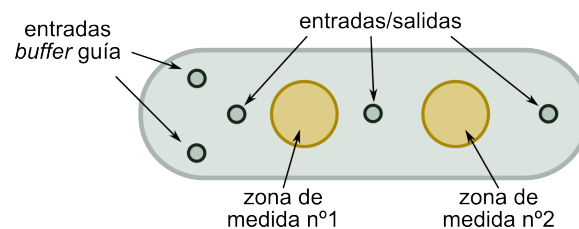
La Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) es una técnica de análisis *label-free* (no requiere marcar el analito para su detección), basada en la detección de cambios del Índice de Refracción (IR) en la superficie de una capa fina de oro en *tiempo real*. Por tanto, la observación del cambio de la señal de SPR per-



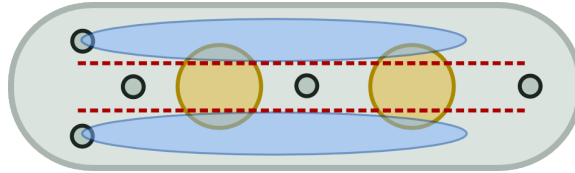
**Figura 3.4:** Equipo SPR2 de Sierra Sensors, para la detección por medio de resonancia de plasmones superficiales.



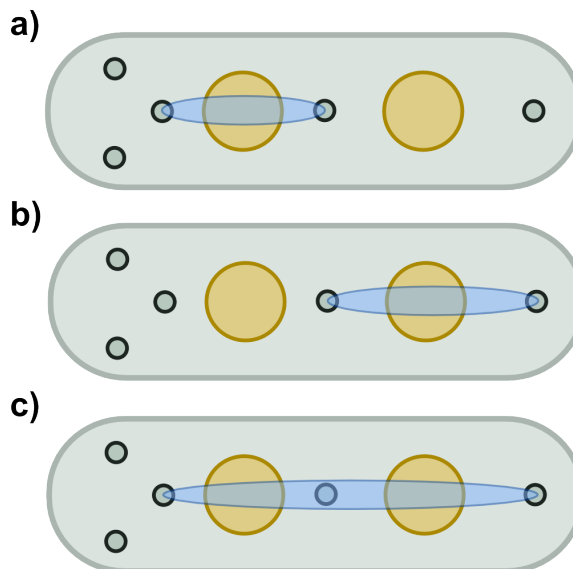
**Figura 3.5:** Chip de Sierra Sensors para la detección por medio de resonancia de plasmones superficiales.



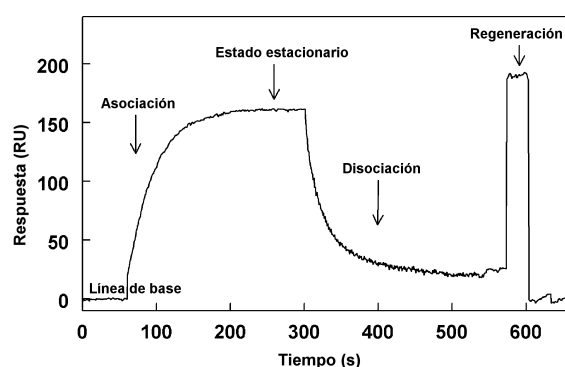
**Figura 3.6:** La celda microfluídica dispone de dos zonas de sensado independientes. Para poder dirigir el flujo a cada una de ellas, el sistema dispone de tres entradas/salidas, así como dos entradas adicionales para crear el *aislamiento hidrodinámico*.



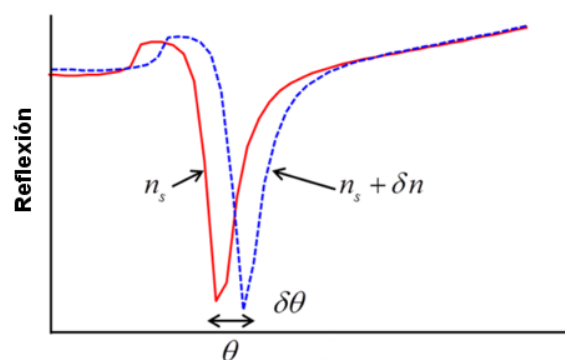
**Figura 3.7:** El sistema de *aislamiento hidrodinámico* permite delimitar el flujo al área central de la celda microfluidica, permitiendo disponer de dos zonas de sensado independientes.



**Figura 3.8:** La configuración microfluidica anteriormente descrita permite realizar inyecciones independientemente en las diferentes zonas de sensado: **a)** zona n°1, **b)** zona n°2 y **c)** las dos zonas a la vez.



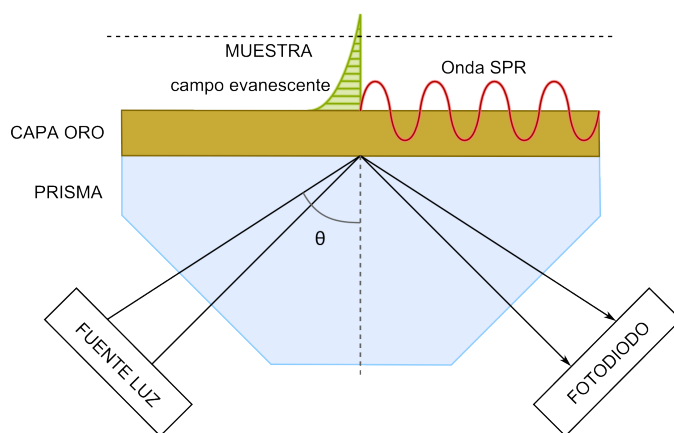
**Figura 3.9:** Sensograma genérico representando una interacción molecular, en la que pueden observarse las diferentes etapas de un ensayo de SPR: línea de base, asociación, estado estacionario, disociación y regeneración superficial.



**Figura 3.10:** El ángulo en el cual la reflexión sufre un hundimiento es especialmente sensible a cambios de masa en la inmediaciones de la capa de oro.

mite no solo el estudio de estados, sino también el análisis de la cinética de las uniones, representado en forma de *sensograma* (Figura 3.9).

El principio de medida se basa en el cambio del IR que produce la acumulación de masa (moléculas) sobre la superficie de oro (Liedberg et al., 1995). La SPR es un fenómeno óptico que implica la excitación de electrones libres oscilantes del metal (plasmones): la energía de los fotones de la luz incidente es transferida a paquetes de electrones de la superficie metálica. Esta excitación óptica de los plasmones, sin embargo, ocurre únicamente bajo ciertas condiciones de resonancia, llamadas Reflexión Total Atenuada (ATR), en las cuales la energía de los fotones es exactamente igual al nivel de energía cuántico de los plasmones. En estas circunstancias concretas, se observa una reducción en la intensidad de la luz reflejada (de Mol y Fischer, 2010). Basicamente, la señal de SPR es la variación del ángulo para el cual se observa la mínima reflexión (Figura 3.10).



**Figura 3.11:** Sensor de SPR con la configuración de Kretschmann. Una capa fina de oro recubre el prisma, sobre la cual se inmovilizan las moléculas de reconocimiento. La superficie es irradiada con luz polarizada, que incide con un ángulo variable. En un ángulo concreto se dan las condiciones de ATR, produciendo una bajada en la intensidad de la luz reflejada: los electrones de la superficie de oro absorben esta energía de la luz, produciendo una onda de plasmones superficiales resonantes.

Existen diferentes configuraciones de SPR; la empleada en este equipo es la llamada configuración de Kretschmann, que consiste en un prisma de vidrio recubierto con una capa fina de oro para generar los plasmones superficiales (Figura 3.11). Cuando la luz incidente adquiere cierto ángulo, se cumplen las condiciones de ATR, bajo las cuales se produce la generación de plasmones superficiales al transmitirse energía de los fotones a los electrones del metal. El campo electromagnético asociado a la luz incidente se acopla a la oscilación de los electrones libres, resultando en una onda resonante de plasmones en la interfaz metal–dieléctrico. Asociado a esta onda, aparece un campo electromagnético evanescente, con una penetración limitada en el medio dieléctrico.

La amplitud del campo evanescente parte de un máximo en la interfaz metal–dieléctrico y decae exponencialmente con la distancia. Por tanto, la señal de SPR más intensa se manifiesta en la inmediación de la superficie de oro: un cambio de masa en esta franja (normalmente se considera una distancia efectiva de 300 nm) produce un cambio en el IR que se traduce en el desplazamiento del ángulo para el cual se da la resonancia de los plasmones superficiales. Este cambio está directamente relacionado con la cantidad de masa unida a la superficie de oro, relación que se mantiene lineal hasta aproximadamente los 50 ng/mm<sup>2</sup> (de Mol y Fischer, 2010).

Hay que tener en cuenta que cualquier cambio en el IR tiene una repercusión directa en la señal de SPR: pequeños cambios en la temperatura o el *running buffer* se traducen en los llamados efectos de masa (*bulk effects*). Normal-



**Figura 3.12:** Separador magnético Dyna-Mag2 de Invitrogen.

mente, estos efectos indeseados se corrigen mediante el uso de una superficie de referencia, la cual permite obtener señales limpias.

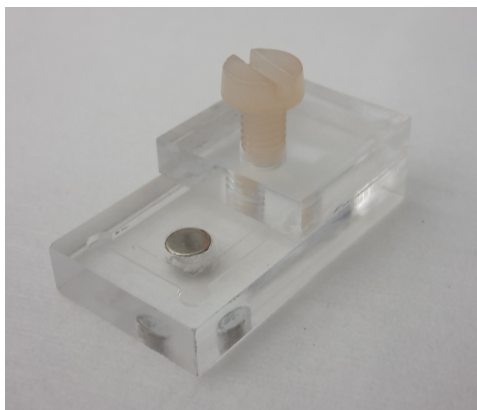
### 3.1.3. Otros instrumentos

En todos los pasos de funcionalización de las MBs se ha empleado el separador magnético Dyna-Mag2 de Invitrogen, con capacidad para 16 viales de 1,5–2 mL (Figura 3.12).

Las MBs modificadas han sido capturadas sobre los electrodos por medio de una base construida a medida en metacrilato (Figura 3.13). Esta contiene el espacio exacto para albergar los electrodos serigrafiados y tiene integrado un imán de neodimio (obtenidos en Aiman GZ) de 4 mm de diámetro y 3 mm de altura, de manera que este se sitúa justo debajo del WE. Los contactos de los electrodos quedan libres para poder conectarlos al potenciostato mediante el cable correspondiente. Para las multideterminaciones, se ha empleado un instrumento análogo, con dos imanes coincidentes con los WE de los electrodos duales.

Los análisis de microscopía han sido realizados con un microscopio óptico Olympus CK40, equipado con una cámara Olympus DP12.

Otros aparatos utilizados de uso común en el laboratorio han sido un agitador magnético Velp MST, un mezclador con vórtice MixMate de Eppendorf y un mezclador con control de temperatura ThermoMixer C de Eppendorf.



**Figura 3.13:** Base magnética, para capturar las partículas sobre los electrodos.

## 3.2. Reactivos y disoluciones

### 3.2.1. Reactivos

Todos los reactivos empleados han sido de calidad analítica.

#### Reactivos para la preparación de disoluciones

- Tween<sup>®</sup> 20 (Tween) (Sigma–Aldrich)
- Dihidrogenofosfato de sodio anhidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Scharlau)
- Hidrogenofosfato disódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Scharlau)
- Ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) (Scharlau)
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) (Scharlau)
- Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ) (Scharlau)
- Agua desionizada ultrapura ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Milli–Q de Millipore)
- Dietanolamina (DEA) (Scharlau)
- Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) (Scharlau)
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30 % (p/v) en  $\text{H}_2\text{O}$  (Sigma–Aldrich)
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Sigma–Aldrich)
- Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) (Scharlau)
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) (Scharlau)

- Clohidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) (Sigma-Aldrich)

#### **Reactivos empleados en la preparación de superficies**

- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich)
- N-Hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich)
- Ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) (Sigma-Aldrich)
- Clohidrato de etanolamina (ETA-HCl) 1M, pH 8,5 (Sierra Sensors)
- Etanol absoluto (EtOH) (Scharlau)
- Perclorato de litio (LiClO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich)
- Ácido 4-aminobenzoico (4-ABA) (Acros Organics)
- Acetato de sodio (NaOAc) pH 4,0 (Sierra Sensors)
- Acetato de sodio (NaOAc) pH 4,5 (Sierra Sensors)
- Acetato de sodio (NaOAc) pH 5,0 (Sierra Sensors)
- Acetato de sodio (NaOAc) pH 5,5 (Sierra Sensors)
- Acetato de sodio (NaOAc) pH 6,0 (Sierra Sensors)
- Nitrógeno (N<sub>2</sub>) (Air Liquid)

#### **MBs**

- Micropartículas magnéticas modificadas con ácido carboxílico (HOOC-MBs) (2,8  $\mu$ M, 30 mg/mL, Dynabeads M-270 de Invitrogen)

#### **AuNPs**

- Nanopartículas de oro funcionalizadas con estreptavidina (SAv-AuNPs) de 20 nm de diámetro (British Biocell International, ref. BA.STP20)
- Nanopartículas de oro funcionalizadas con estreptavidina (SAv-AuNPs) de 40 nm de diámetro (British Biocell International, ref. BA.STP40)



**Inmunoreactivos, marcadores enzimáticos y mediadores**

- Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), humano recombinante (Pepro-Tech, ref. AF-300-01A)
- Anticuerpo de captura anti-TNF $\alpha$  (antiTNF $\alpha$ ) monoclonal de ratón (PeproTech, ref. 500-M26)
- Anticuerpo de detección anti-TNF $\alpha$  biotinilado (biotina-antiTNF $\alpha$ ) policlonal de conejo (PeproTech, ref. 500-P31ABT)
- Kit ELISA para TNF $\alpha$  (Immunotech, ref. IM1121)
- Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico 2 (ErbB2) humano recombinante (Sino Biological Inc., componente del kit ELISA ref. SEKA10004)
- Anticuerpo de captura anti-ErbB2 (antiErbB2) monoclonal de conejo (Sino Biological Inc., componente del kit ELISA ref. SEKA10004)
- Anticuerpo de detección anti-ErbB2 conjugado con HRP (antiErbB2-HRP) monoclonal de conejo (Sino Biological Inc., componente del kit ELISA ref. SEKA10004)
- ErbB2 humano recombinante (Sino Biological Inc., ref. 10004-H08H)
- antiErbB2 monoclonal de ratón (Sino Biological Inc., ref. 10004-MM03)
- Anticuerpo de detección anti-ErbB2 biotinilado (biotina-antiErbB2) monoclonal de ratón (Sino Biological Inc., ref. 10004-MM01B)
- Receptor de Estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) recombinante humano (R&D Systems Inc., componente del kit ELISA ref. DYC5715)
- Anticuerpo de captura anti-ER $\alpha$  (antiER $\alpha$ ) de oveja (R&D Systems Inc., componente del kit ELISA ref. DYC5715)
- Anticuerpo de detección anti-ER $\alpha$  biotinilado (biotina-antiER $\alpha$ ) de oveja (R&D Systems Inc., componente del kit ELISA ref. DYC5715)
- Receptor de Progesterona (PR) recombinante humano (R&D Systems Inc., componente del kit ELISA ref. DYC5415)
- Anticuerpo de captura anti-PR (antiPR) de oveja (R&D Systems Inc., componente del kit ELISA ref. DYC5415)
- Anticuerpo de detección anti-PR biotinilado (biotina-antiPR) de oveja biotinilado (R&D Systems Inc., componente del kit ELISA ref. DYC5415)
- Inmunoglobulina G de ratón (MIgG) (Jackson ImmunoResearch, ref. 015-000-003)

- Inmunoglobulina G humana (HIgG) (Jackson ImmunoResearch, ref. 009-000-003)
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Jackson ImmunoResearch, ref. 001-000-161)
- Albúmina de suero humano (HSA) (Jackson ImmunoResearch, ref. 009-000-003)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Fisher BioReagents)
- Conjugado de estreptavidina con HRP (SAv-HRP) (Jackson ImmunoResearch, ref. 016-030-084)
- Conjugado de estreptavidina con Fosfatasa alcalina (AP) (SAv-AP) (Jackson ImmunoResearch, ref. 016-050-084)
- Hidroquinona (HQ) (Sigma-Aldrich)
- 1-naftil fosfato (1-NP) (Sigma-Aldrich)

### 3.2.2. Disoluciones

**Disolución reguladora de fosfato 10 mM (pH 7,5)** Contiene 260 mg de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 1,153 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en un litro de  $\text{H}_2\text{O}$  y se ha ajustado el pH a pH 7,5 adicionando NaOH 1,0 M. .

**Disolución reguladora de fosfato 50 mM (pH 6,0) (PB)** Contiene 6,07 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 0,852 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en un litro de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**PB con 1 mM de HQ** Preparada justo antes de ser empleada, disolviendo 0,055 g de HQ en 500 mL de PB .

**Disolución reguladora de fosfato salino 10 mM (pH 7,5) (PBS)** Disolución reguladora de fosfato 10 mM suplementada con 137 mM de NaCl y 2,7 mM de KCl.

**PBS con Tween (pH 7,5) (PBST)** Disolución reguladora de fosfato salino 10 mM suplementada con 0,05 % (v/v) de Tween.

**PBST con un 0.2 % de BSA (PBST-BSA)** Disolución reguladora de fosfato salino 10 mM suplementada con 0,05 % (v/v) de Tween y 0,2 % (p/v) de BSA.

**Disolución reguladora de MES 50 mM (pH 5,0) (MES)** Se prepara una disolución de 50 mM de MES en  $\text{H}_2\text{O}$  y se ajusta el pH a 5,0 por medio de la adición de NaOH 1,0 M.

**Disolución reguladora de Tris-HCl 100 mM (pH 7,2) (Tris-HCl)** Contiene 6,05 g de Tris-HCl diluido en H<sub>2</sub>O y el pH se ha ajustado a 7,2 añadiendo HCl 1,0 M.

**Disolución reguladora de DEA 100 mM (pH 9,8) (DEA)** Disolución de 100 mM de DEA suplementada con 1 mM de MgCl<sub>2</sub> y 100 mM de KCl y con el pH ajustado a 9,8 por medio de HCl 1,0 M.

**Disolución 3 mM 4-ABA** en EtOH con 100 mM de LiClO<sub>4</sub>. Contiene 411,42 mg de 4-ABA y 1063,9 mg de LiClO<sub>4</sub> en 100 mL de EtOH.

**Disolución de MUA 2,5 mM en EtOH** Para preparar 200 µL de disolución, se diluyen 109,2 µg de MUA en EtOH.

**Disolución *Piranha*** Se prepara mezclando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una proporción de 3:1. Es preciso añadir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poco a poco sobre el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y emplearlo inmediatamente.

**Disolución 400 mM EDC en H<sub>2</sub>O** Se prepara una disolución de 400 mM de EDC en H<sub>2</sub>O, disolviendo 766,8 mg de EDC en 10 mL de H<sub>2</sub>O, y se preserva alícuotada y congelada a -18°C.

**Disolución 100 mM NHS en H<sub>2</sub>O** Se prepara una disolución de 100 mM de NHS en H<sub>2</sub>O, disolviendo 115,09 mg de EDC en 10 mL de H<sub>2</sub>O, y se preserva alícuotada y congelada a -18°C.

**Disolución 200 mM EDC en MES pH 5,0** Se prepara una disolución de 200 mM de EDC en MES pH 5,0, disolviendo 383,4 mg de EDC en 10 mL de MES, y se preserva alícuotada y congelada a -18°C.

**Disolución 200 mM NHS en MES pH 5,0** Se prepara una disolución de 200 mM de NHS en MES pH 5,0, disolviendo 230,18 mg de EDC en 10 mL de MES, y se preserva alícuotada y congelada a -18°C.

**Disolución de bloqueo de BSA en MES pH 5,0** Se prepara una disolución de 10 mg/mL de BSA en MES pH 5,0.

**Disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM** Disolución del sustrato enzimático, preparada en H<sub>2</sub>O justo antes de su utilización, disolviendo 40,86 µL del sustrato comercial (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 % p/v) en 3,96 mL de H<sub>2</sub>O.

### 3.2.3. Muestras

- Suero humano de varón, obtenido a partir de plasma AB (Sigma, ref. H4522)
- Muestras reales de suero de dos individuos sanos (Biodonostia Health Research Institute)



Figura 3.14: Manipulación de las MBs.

### 3.3. Procedimientos experimentales

En esta sección se detallan todos los protocolos o procedimientos experimentales llevados a cabo a lo largo de este trabajo.

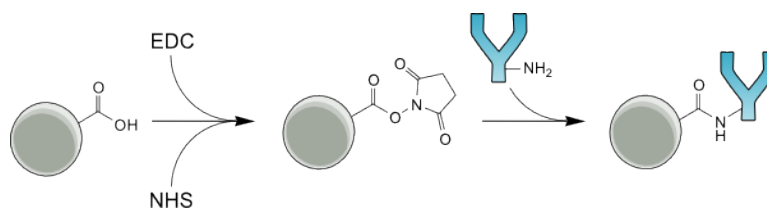
#### 3.3.1. Manipulación de las MBs

El uso de Partículas Magnéticas (MBs) introduce importantes ventajas respecto a la realización directa del inmunoensayo sobre la superficie del electrodo de trabajo de los electrodos serigrafiados. Además de mejorar la sensibilidad de la determinación (aumentado la relación entre superficie de interacción y volumen) y minimizar uniones no específicas en matrices complejas, simplifica notablemente el proceso de realización del inmunoensayo.

Empleando un separador magnético y una pipeta, pueden realizarse todas las etapas de incubación y lavado de manera muy sencilla. El proceso básico para suspender en una solución B las MBs suspendidas en la disolución A sería el siguiente (ver Figura 3.14):

- Colocar el vial en el separador magnético 2 min. El imán del separador atrae las MBs contra la pared del vial.
- Con el vial colocado en la base magnética retirar la disolución A con ayuda de una micropipeta.
- Añadir la disolución B y retirar el vial de la base magnética para resuspender las MBs.

En los procesos de lavado, la disolución en la que están resuspendidas las MBs se renueva 3 veces consecutivas con la disolución de lavado adecuada. En



**Figura 3.15:** Proceso de funcionalización de las HOOC-MBs por medio de EDC/NHS

los procesos de incubación, se coloca el vial en un incubador a la temperatura y velocidad adecuadas y durante el tiempo establecido en el protocolo.

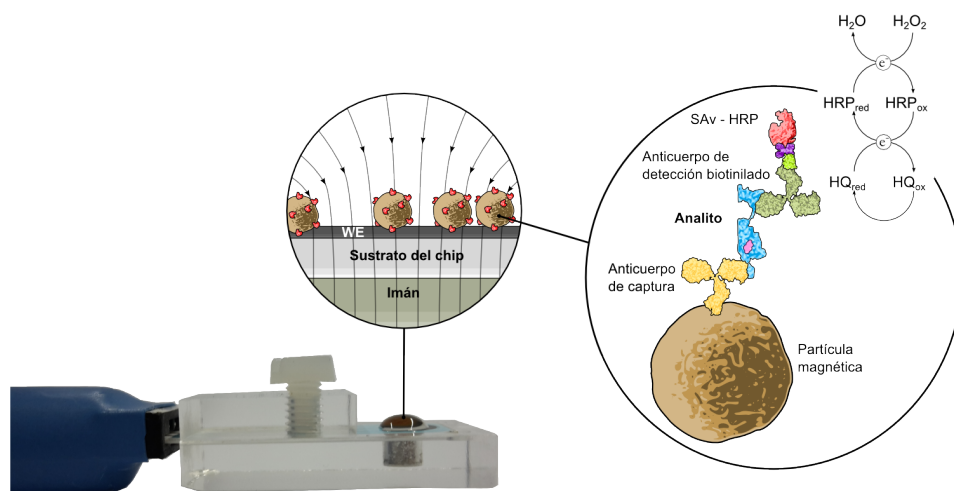
### 3.3.2. Funcionalización de las HOOC-MBs

Para funcionalizar una superficie, es decir, para crear una superficie de sensor específica, es necesario unir a la misma una molécula de reconocimiento, también llamada *ligando*. Existen varios métodos para realizar esta operación, pero la más habitual es la *unión por aminas primarias*. Este método es válido para anclar moléculas que contienen grupos amino a superficies que contengan grupos carboxílicos, como es el caso de aminoácidos y proteínas. De este modo, se obtiene un enlace *covalente*, resultando en una funcionalización superficial muy estable, capaz de soportar multitud de ciclos de regeneración (de Mol y Fischer, 2010). Esta unión por aminas primarias se realiza a través de la estrategia EDC/NHS, ilustrada en la Figura 3.15.

Las disoluciones de EDC (200 mM en MES pH 5,0) y NHS (200 mM en MES pH 5,0) se mezclan inmediatamente después de haberlos descongelado. Se exponen las HOOC-MBs lavadas en MES a la mezcla y se incuban en agitación constante (950 rpm, 25°C) durante 35 minutos. De esta manera, se obtienen ésteres de succinimida reactivos en la superficie, que reaccionan espontáneamente con las aminas del ligando. Tras lavar las HOOC-MBs en MES 3 veces consecutivas, se incuban las partículas con la disolución de ligando, en MES durante 1 h (950 rpm, 25°C). Tras lavar las partículas en MES, se bloquean los ésteres que no han reaccionado mediante una incubación en ETA-HCl 1 M (pH 8) de 1 h (950 rpm, 25°C). Después de un lavado en Tris-HCl y dos en PBST, las HOOC-MBs están listas para ser usadas o pueden almacenarse a 4°C en PBS filtrado durante el tiempo de estabilidad determinado para cada bioconjugado.

### 3.3.3. Magnetoinmunoensayo

Las MBs funcionalizadas se lavan en PBST y a continuación se exponen a la muestra, incubándolas durante 1 h (950 rpm, 25°C). Tras 3 lavados con PBST,



**Figura 3.16:** Descripción del proceso de formación del inmunocomplejo sobre las MBs y su captura magnética sobre el SPCE antes de la determinación electroquímica final.

se incuban durante 1 h (950 rpm, 25°C) con el anticuerpo secundario. Si este anticuerpo está marcado con HRP, el inmunocomplejo está completo. Si por el contrario, el anticuerpo de detección está biotinilado, será necesario realizar una etapa de incubación posterior de 10 min (950 rpm, 25°C) en SAv-HRP (previa etapa de limpieza en PBST). Tras un último ciclo de limpieza en PBST, las partículas se resuspenden en PB pH 6,0 y quedan listas para la determinación electroquímica. Un esquema del inmunocomplejo formado puede verse en la Figura 3.16.

Para realizar la medida, se toman 45  $\mu\text{L}$  de suspensión de las MBs y se colocan sobre el WE del chip, que está situado sobre la base magnética (ver Figura 3.16). Se conecta el chip al conector y se introduce (junto con la base magnética) en un vaso de precipitados de 10 mL que contiene 8 mL de una disolución de PB pH 6,0 con 1 mM de HQ en agitación.

Se arranca la medida amperométrica (ver Sección 3.1.1.1) aplicando el potencial adecuado, se espera hasta la estabilización de la línea base durante 1 min aproximadamente y se añaden 40  $\mu\text{L}$  de sustrato enzimático ( $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM) monitorizándose la variación de corriente catódica hasta alcanzar el estado estacionario.

### 3.3.4. Funcionalización superficial de SPCEs

En los casos en los que se ha realizado una funcionalización directa de la superficie del WE del SPCE, se han empleado dos técnicas diferentes: unión covalente y adsorción física.

### 3.3.4.1. Unión covalente

Para realizar esta funcionalización, se ha modificado la superficie del WE con 4-ABA, para posteriormente unir la molécula de reconocimiento por medio de la química EDC/NHS. En primer lugar, se forma una película de 4-ABA para obtener una capa de grupos carboxilo en la superficie del WE. Para ello, se sumerge el SPCE en la disolución de 4-ABA 3 mM y se realiza una Voltamperometría Cíclica (CV), bajo los siguientes parámetros:

Ciclos: 3  
Rango: 0 – 1 V  
Velocidad: 10 mV/s

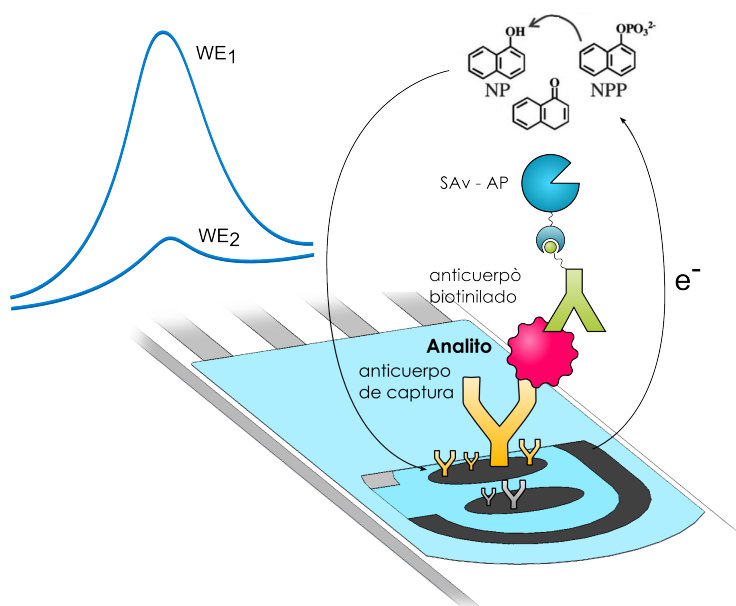
Los grupos carboxilo de la capa de 4-ABA recién formada se activan colocando una gota de 2  $\mu$ L de una mezcla fresca de disoluciones de EDC (200 mM en MES pH 5,0) y NHS (200 mM en MES pH 5,0) recién descongeladas en una proporción 1:1. Se deja incubar la gota durante 30 min en una cámara húmeda, tras lo cual se enjuaga la superficie con agua destilada y se seca con N<sub>2</sub>.

A continuación, se pone una gota de 2  $\mu$ L de la disolución de anticuerpo primario (en MES pH 5,0) sobre el WE y se deja incubar en un ambiente húmedo durante 1 h. Tras esta incubación, se enjuaga el electrodo con agua destilada y se seca bajo corriente de N<sub>2</sub>.

Los grupos carboxilo sin reaccionar se bloquean mediante una incubación de 1 h con una gota de 5  $\mu$ L de ETA-HCl (1 M, pH 8,5) en ambiente húmedo. Tras enjuagar con agua y secar con N<sub>2</sub> la superficie del electrodo, se realiza un último bloqueo, mediante una incubación en ambiente húmedo de una gota de 2  $\mu$ L de BSA (10 mg/mL en MES pH 5,0) durante 1 h.

### 3.3.4.2. Adsorción física

En esta estrategia de funcionalización, los anticuerpos de captura se unen a la superficie del WE por *fisisorción*, para lo cual se coloca una gota de 2  $\mu$ L de la disolución de la molécula de reconocimiento (en MES pH 5,0) sobre el WE y se deja secar en condiciones ambientales controladas (21°C, 45 % de humedad). Tras este proceso ( $\approx$  2 h), se enjuaga la superficie con agua destilada y se seca con N<sub>2</sub>. Finalmente, se realiza un bloqueo de la superficie incubando una gota de 5  $\mu$ L de BSA (10 mg/mL en MES pH 5,0) en ambiente húmedo durante 1 h. La funcionalización se completa con un último paso de lavado con agua destilada y secado bajo un chorro de N<sub>2</sub>.



**Figura 3.17:** Determinación electroquímica en un SPCE dual por medio de DPV. Uno de los WE se ha empleado para la medida y el otro como referencia.

### 3.3.5. Determinación electroquímica en SPCEs

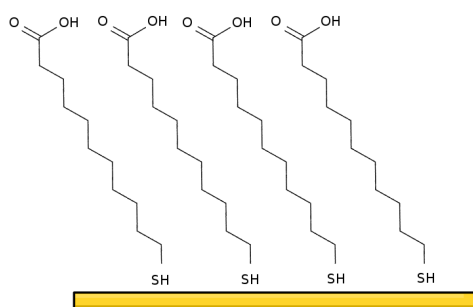
En los chips desechables con fluídica integrada, se ha optado por un inmunoensayo en un solo paso y como técnica de medida la DPV.

Para formar el inmunocomplejo en un único paso, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de muestra a 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo secundario marcado con AP (o, en su defecto, una mezcla de anticuerpo de detección biotinilado y SAV-AP). Este compuesto se introduce en la celda microfluídica del chip por medio de una jeringa a través del puerto de entrada y se deja incubar durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se renueva el volumen de la celda con PBS antes de introducir 100  $\mu\text{L}$  de una solución de 1 mg/mL de 1-NP en DEA pH 9,6. Tras una incubación de 2 min a temperatura ambiente, se registra la señal de DPV. En la Figura 3.17 puede verse ilustrado el proceso completo.

### 3.3.6. Preparación de la SAM sobre superficies de oro

Para la funcionalización de superficies de oro, concretamente la superficie de los chips de SPR, es necesario formar una Monocapa Autoensamblada (SAM) de un mercaptoácido. De esta forma, se crean sobre la superficie sensora grupos carboxílicos que permiten la posterior unión covalente de moléculas de reconocimiento por medio de sus aminas primarias.





**Figura 3.18:** Formación de la SAM de MUA sobre la superficie de oro del chip de SPR.

Para la construcción de la SAM sobre los chips de oro de SPR, en primer lugar es necesario limpiar la superficie correctamente:

1. Sumergir el chip 1 minuto en una disolución de *Piranha*.
2. Enjuagar con abundante agua destilada.
3. Secar con  $N_2$ .

A continuación, se forma la monocapa por inmersión del chip en una disolución de 2,5 mM de MUA en EtOH. Se deja el chip incubando durante 12 h en un vaso de precipitados, totalmente cubierto por la solución de MUA tapado con parafilm y fuera del alcance de la luz, para volver a lavar el chip antes de realizar la funcionalización mediante los siguientes pasos:

1. Sumergir el chip en EtOH.
2. Enjuagar con abundante agua destilada.
3. Secar con  $N_2$ .

El MUA se une al oro por medio de sus grupos tioles, formando una unión Au-S en un extremo, con los grupos carboxilo en el contrario, tal y como puede observarse en la Figura 3.18. Una vez formada la monocapa, el chip puede guardarse a 4°C hasta su posterior uso.

### 3.3.7. Funcionalización de los chips de SPR

El anclaje del ligando o molécula de reconocimiento sobre la superficie sensora de los chips de SPR se realiza mediante el empleo de la química EDC/NHS, dando como resultado un enlace covalente altamente estable (ver Sección 3.3.2).

Para realizar este enlace, se parte de la superficie modificada con grupos carboxilo, obtenida a través de la formación de una SAM (ver Sección 3.3.6). Se descongelan alícuotas de EDC (400 mM en H<sub>2</sub>O) y NHS (100 mM en H<sub>2</sub>O) y se mezclan en una proporción 1:1 inmediatamente antes de su uso. Se expone el chip a la mezcla de EDC/NHS durante 5 minutos, para después introducir el ligando disuelto en una solución reguladora de NaOAc de un pH adecuado. Finalmente, los ésteres activos residuales se bloquean por medio de una disolución de ETA-HCl 1 M.

#### 3.3.7.1. Preconcentración de la molécula de captura

Para obtener una buena funcionalización de la superficie, es necesario elegir las condiciones en las que se lleva a cabo la inmovilización del ligando. A concentraciones de proteína típicas (20–200 µg/mL), la cantidad de ligando que se uniría a la superficie resultaría excesivamente baja si se confía únicamente en la difusión; es por esto que es necesario emplear algún mecanismo para aumentar la eficiencia de la inmovilización. La principal herramienta empleada para obtener un aumento del rendimiento es la atracción electrostática del ligando a la superficie, efecto conocido como *preconcentración* y mediante el cual puede obtenerse en la superficie una concentración de la molécula de reconocimiento mucho mayor de la que se obtiene por simple difusión.

La superficie del chip tiene una carga negativa en un medio con un pH superior a 3,5. Por tanto, el valor del pH de la solución empleada en la disolución debería ser superior a 3,5 y al mismo tiempo inferior al punto isoeléctrico<sup>1</sup> del ligando. La correcta elección del pH de la disolución reguladora en la que se realiza la inmovilización es, por tanto, un parámetro crítico.

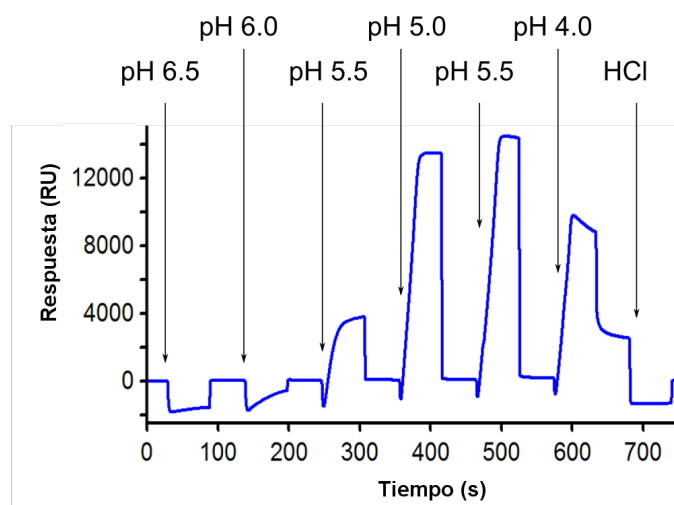
Para elegir el valor óptimo, se realiza una *exploración de pH*: se preparan disoluciones del ligando en disoluciones reguladoras de NaOAc a diferentes pH (pH 4,0 – pH 6,0) y se realizan inyecciones consecutivas sobre la superficie sin activar mediante EDC/NHS para ver qué valor ofrece la mayor preconcentración (ver Figura 3.19).

#### 3.3.8. Medidas *label-free* en SPR

Para la detección *label-free* mediante SPR, se realiza una inyección de 200 µL de muestra a 25 µL/min sobre un chip funcionalizado y se registra el cambio de señal. La captura del analito por parte de los ligandos presentes en la superficie da lugar a una acumulación de moléculas en la superficie sensora con el consiguiente cambio en el IR del entorno.

---

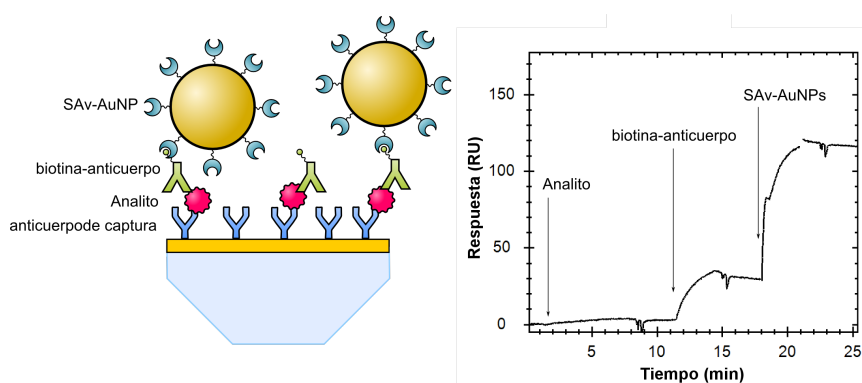
<sup>1</sup>pH para el cual la carga eléctrica media de la molécula es cero.



**Figura 3.19:** Optimización de pH para elegir la disolución reguladora óptima para maximizar la preconcentración de ligando en la superficie. En este ejemplo, un pH de 5,5 es el que ofrece una mayor preconcentración.

### 3.3.9. Amplificación mediante AuNPs en SPR

Cuando la detección *label-free* no aporta toda la sensibilidad requerida, es necesario amplificar la señal de SPR. Para ello, y tras incubar la muestra como se explica en el apartado anterior, se hacen pasar 75  $\mu\text{L}$  de anticuerpo secundario biotinilado, en primer lugar, y 75  $\mu\text{L}$  de una disolución de SAV-AuNPs a continuación. En cada uno de los pasos puede observarse un aumento considerable de la señal (ver Figura 3.20).



**Figura 3.20:** Amplificación de la señal de SPR con AuNPs: inmunocomplejo formado y sensograma asociado.

### 3.3.10. Regeneración superficial de los chips de SPR

Mediante la regeneración superficial, se consigue recuperar la superficie funcionalizada original (manteniendo intacto el ligando), disociando cualquier inmunocomplejo que se haya formado sobre la misma.

Para regenerar la superficie, se han realizado inyecciones de 25  $\mu$ L de HCl 100 mM. Este proceso permite liberar todas las proteínas unidas a la superficie, manteniendo intacta la capa de anticuerpos de captura (anclados covalentemente a la superficie de oro del chip). Se ha demostrado la estabilidad de la funcionalización superficial durante 300 ciclos de inmovilización-regeneración, sin ninguna pérdida en el rendimiento de la detección.

### 3.3.11. Preparación de cultivos celulares

La preparación de los cultivos celulares la realizó el Dr. Rodrigo Barderas Manchado, perteneciente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. En este trabajo se han empleado tres líneas celulares de cáncer de mama, caracterizadas por el perfil de receptores que se indica:

- MCF-7 (ErbB2- | ER+ | PR+)
- MDA-MB-436 (ErbB2- | ER- | PR-)
- SK-BR-3 (ErbB2+ | ER- | PR-)

El crecimiento de los cultivos celulares se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub> en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), con un 10 % de suero fetal bovino, penicilina, estreptomycin y l-glutamina 2,5 mM suplementada con nutrientes (Ceran et al., 2012; Torrente-Rodríguez et al., 2015).

### 3.3.12. Obtención de lisados celulares

Los lisados celulares fueron preparados por el Dr. Rodrigo Barderas Manchado siguiendo el siguiente protocolo. Para lisar las células, estas se lavaron con PBS frío, se incubaron en PBS 4 mM EDTA durante 5 minutos para levantar las células de la placa y se centrifugaron a 1200 rpm para eliminar el PBS 4 mM EDTA. A continuación, se añadió 1 mL de buffer de lisis frío, suplementado con un cocktail inhibidor de 1X proteasa, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y ortovanadato de sodio activado 1 mM. Posteriormente, las células se incubaron en hielo durante 10 minutos, se pasaron 10 veces a través de una

aguja de calibre 25 unida a una jeringa de 1 mL y se transfirieron a un tubo de microcentrifugado. Finalmente, se clarificó el lisado centrifugándolo a 13200 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Tras determinar la concentración total de proteína por medio de un kit de ensayo de proteínas BCA, los lisados se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

### **3.3.13. Análisis de SDS-PAGE e inmunodetección**

Los análisis de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico (SDS-PAGE) e inmunodetección los realizó el Dr. Rodrigo Barderas Manchado. Todos los lisados celulares se analizaron por medio de SDS-PAGE 10% con tintado Coomassie Blue R-250. Para la inmunodetección, se analizaron en paralelo 50 µg de cada extracto de proteínas por medio de SDS-PAGE 10% (Barderas et al., 2013b). Posteriormente, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C-extra), por transferencia semiseca (Bio-Rad) (Barderas et al., 2013a). Tras bloquearlas, las membranas se incubaron alternativamente con anticuerpos específicos o anticuerpos de control inespecíficos (antitubulina monoclonal), y a continuación con 20 µg/mL de HRP-antiIgG de ratón. Finalmente, se visualizaron las proteínas reactivas específicas por medio del sustrato SuperSignal West Pico Maximum Substrate (Pierce).

### **3.3.14. Obtención de muestras de suero**

Para obtener las muestras de suero, se centrifugaron las extracciones sanguíneas a 1500 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante (suero) por medio de una micropipeta y se preservó a -80°C en alícuotas. Este proceso se llevó a cabo en el Biodonostia Health Research Institute).

## **3.4. Cálculos**

En esta sección se describen los fundamentos básicos de las herramientas estadísticas y analíticas empleadas en este trabajo.

### **3.4.1. Curvas de calibración**

En este trabajo se han obtenido curvas (o funciones) de calibración para varios métodos analíticos (electroquímica, SPR, ELISA, etc.). Estas curvas relacionan la Señal medida ( $S$ ) con la Concentración ( $C$ ) de analito y requieren

un tratamiento estadístico para determinar las características analíticas de los ensayos realizados.

Las funciones de calibración se calculan mediante una regresión de los datos experimentales a una expresión matemática adecuada. Debido al tipo de procesos de reconocimiento biomolecular que se han estudiado, las funciones utilizadas en los ajustes se han reducido a las dos siguientes:

■ **Ajuste lineal:**

$$S = r \cdot C + s_0 \quad (3.1)$$

■ **Modelo de afinidad (interacción 1:1):**

Este modelo se basa en el estado de equilibrio de una interacción simple (1:1) analito-ligando (Pollard, 2010) con una constante de equilibrio  $K_D$ . La ecuación que describe la curva toma una forma sigmoidal:

$$S = \frac{S_{max} \cdot C}{C + K_D} + b \quad (3.2)$$

A la hora de utilizar este modelo es importante disponer de datos en todo el rango de concentraciones, especialmente en la zona de máxima pendiente (alrededor de  $K_D$ ).

Es necesario mencionar que el número de medidas independientes utilizadas para realizar las regresiones siempre ha sido mucho mayor que el número de parámetros a determinar, con lo que el exceso de información se ha utilizado para realizar predicciones estadísticas sobre los mismos. Estos cálculos han sido realizados utilizando el software de tratamiento de datos KaleidaGraph (Synergy Software).

#### 3.4.1.1. Intervalo de confianza

Para predecir el valor de  $C$  a partir de la respuesta  $S$  del instrumento, se ha utilizado la curva de calibración (obtenida mediante regresión). Lógicamente, esta predicción tiene una incertidumbre asociada que se puede expresar como un *intervalo de confianza* que se calcula mediante la siguiente fórmula (Burke, 2001):

$$C_{predicción} = \left( \frac{(\bar{S} - a)}{b} \right) \pm \left( \frac{t \cdot RSE}{b} \right) \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{S} - \bar{s})^2}{b^2(n-1)\sigma_{(c)}^2}} \quad (3.3)$$

donde  $a$  es la intersección con el eje de ordenadas y  $b$  la pendiente, ambos valores obtenidos de la regresión.  $\bar{S}$  es el valor medio de la respuesta para  $m$

réplicas.  $\bar{s}$  es el promedio de  $s$  para los  $n$  puntos del calibrado.  $t$  es el valor crítico para  $n - 2$  (en este trabajo se ha utilizado un nivel de significación de 0,05).  $\sigma_{(c)}$  es la desviación estándar para los valores de  $c$  para los  $n$  puntos del calibrado. El  $RSE$  representa el error estándar de los residuos de la calibración.

#### 3.4.1.2. Significación estadística

Para comprobar la significación estadística de las pendientes de dos curvas de calibración obtenidas de manera independiente, se ha utilizado la prueba  $t$  de Student (a un nivel de significación de 0,05). Estos cálculos se han hecho a través de una calculadora específica (<http://in-silico.net/tools/statistics/ttest>)<sup>2</sup>.

#### 3.4.1.3. Método de las adiciones estándar

Para determinar una concentración desconocida de analito en algunas muestras reales se ha empleado el método de las adiciones estándar. Para ello se suplementa la muestra con cantidades conocidas de analito y se mide la respuesta de cada una de estas adiciones. Mediante regresión lineal se obtiene una curva de calibración cuyo corte con el eje de abscisas (por extrapolación) marcará la concentración de la muestra (ver Figura 3.21).

### 3.4.2. Características analíticas

#### 3.4.2.1. LD y LQ

El valor del Límite de Detección (LD) se ha calculado como la concentración correspondiente al triple de la Desviación Estándar (SD) de 10 muestras con un contenido nulo de analito (blanco). El valor del Límite de Cuantificación (LQ) se ha calculado como 10 veces la SD del blanco (ver Figura 3.22).

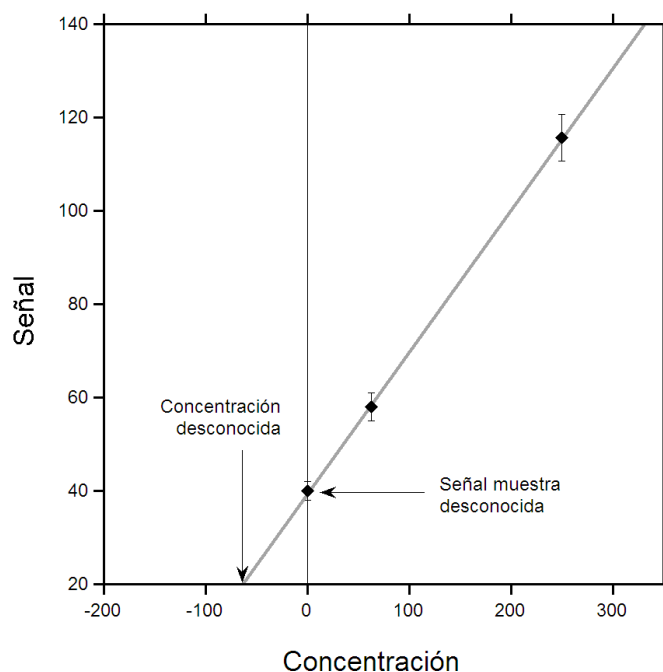
#### 3.4.2.2. RSD

El coeficiente de variación o Desviación Estándar Relativa (RSD) se ha empleado como medida de la dispersión de la distribución de datos al repetir una medida. Este coeficiente expresa el cociente de la desviación estándar y la media de una serie de datos:

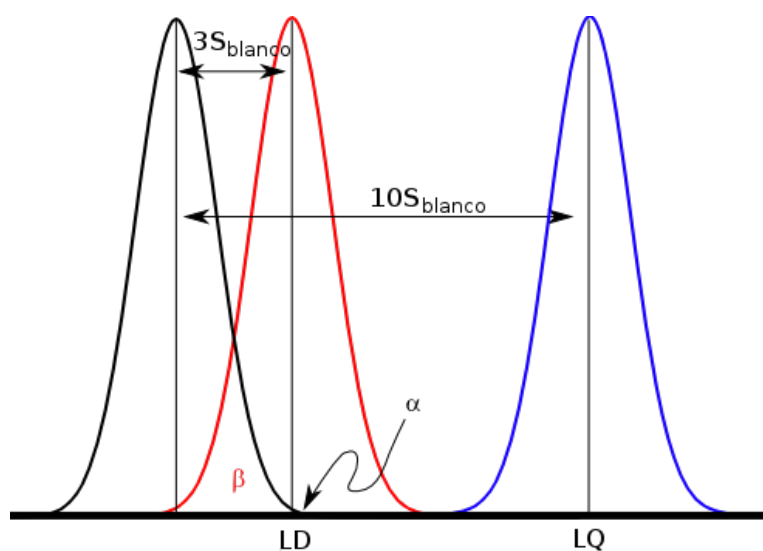
$$RSD = \frac{SD(x)}{\bar{x}} \quad (3.4)$$

---

<sup>2</sup>comprobado en noviembre de 2016



**Figura 3.21:** Determinación de la concentración por el método de las adiciones estándar



**Figura 3.22:** Para una distribución normal, la probabilidad de un falso positivo para una señal en el LD ( $\alpha$ ) es del 1%. Sin embargo, la probabilidad de un falso negativo ( $\beta$ ) es del 50%. Para una señal situada el LQ, la probabilidad de un falso negativo también es mínima.



En todos los casos, este parámetro se ha calculado con al menos 5 medidas.

#### **3.4.2.3. Estudios de recuperación**

Para conocer la efectividad de algunos ensayos llevados a cabo en este trabajo se ha utilizado la metodología de los estudios de recuperación (recovery tests). Para ello se suplementan las muestras con una cantidad conocida analito y se determina su concentración haciendo al menos 3 réplicas. El porcentaje de recuperación se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación [\%]} = \frac{c_a}{c_c} \cdot 100 \quad (3.5)$$

siendo  $c_a$  la concentración de la muestra analizada y  $c_c$  la concentración conocida.

## Capítulo 4

# Resultados y discusión

Un *biosensor* es un dispositivo analítico compuesto por dos elementos:

1. Un elemento de reconocimiento biológico que interactúa específicamente con el analito.
2. Un elemento transductor que transforma el evento de reconocimiento en una señal mensurable.

El núcleo del trabajo de esta tesis se ha llevado a cabo en el campo de los inmunosensores electroquímicos: el reconocimiento se realiza por medio de anticuerpos<sup>1</sup> específicos y la transducción se basa en principios electroquímicos. Esta técnica analítica se ha complementado con medidas de SPR, en la que se utilizan los mismos elementos de reconocimiento pero se emplea un transductor óptico (véase la Sección 3.1.2.1).

En cualquier caso, las diferentes plataformas sensoras desarrolladas en este trabajo pueden dividirse en dos familias principales atendiendo a la *aplicación*:

- Detección de biomarcadores de *inflamación*.
- Detección de biomarcadores de *cáncer de mama*.

### 4.1. Determinación de biomarcadores de inflamación

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es un importante biomarcador de naturaleza protéica (ver Capítulo 2.1), involucrado en varias afecciones de gran incidencia como la artritis reumatoide, la enfermedad de Chron y muchos

---

<sup>1</sup> también conocidos como *inmunoglobulinas*, que dan significado al prefijo *inmuno* empleado en todos aquellos elementos en los que los anticuerpos juegan un papel central.

otros procesos inflamatorios, incluyendo el cáncer (Aggarwal, 2003). Teniendo en cuenta el impacto de estas afecciones y la importante información que el TNF $\alpha$  aporta para su diagnóstico, pronóstico o tratamiento, se han desarrollado dos sensores para la detección específica de este biomarcador, basados ambos en una detección electroquímica, pero explorando en cada uno de ellos atributos y mejoras diferenciales:

- Un biosensor desechable, integrado en un chip y cuya rapidez de medida, simplicidad y bajo coste del mismo son sus cualidades más destacadas.
- Un biosensor amperométrico, basado en el uso de micropartículas magnéticas y que se caracteriza por una sensibilidad y especificidad excelentes.

#### **4.1.1. Inmunosensor amperométrico integrado para la determinación de TNF $\alpha$**

Actualmente, el desarrollo de plataformas sensoras desechables y de bajo coste resulta del máximo interés, no solo en el campo del diagnóstico (p. ej. Nahavandi et al., 2014), sino también en otros ámbitos tan diversos como el medioambiental (p. ej. Jang et al., 2011) o el alimentario (p. ej. Yoon y Kim, 2012). La detección electroquímica destaca por delante de otras técnicas analíticas precisamente en estas propiedades, como son la rapidez del análisis y su bajo coste, junto con la alta sensibilidad, la capacidad de realizar múltiples medidas simultáneas (multiplexado) y su posibilidad de miniaturización en un dispositivo portátil.

La combinación de esta técnica de sensado con una microfluídica sencilla permite aprovechar al máximo las ventajas anteriormente citadas, posibilitando un control preciso sobre el volumen de la muestra, así como una integración global en un dispositivo de medida totalmente desechable. Por tanto, una microfluídica de bajo coste es una opción especialmente atractiva para su utilización en el análisis de muestras reales, en las que un dispositivo de un solo uso es la mejor alternativa a la hora de evitar cualquier contaminación indeseada. Los electrodos serigrafiados se presentan como una opción ideal, ya que su producción a gran escala permite obtener a un precio muy bajo una calidad superficial y homogeneidad muy altas (Fanjul-Bolado et al., 2008).

##### **4.1.1.1. Fabricación del chip desechable**

El chip o dispositivo de medida integrado que se propone, es una modificación sencilla de un SPCE al que se le ha añadido una encapsulación y unas

entradas y salidas fluídicas con el objetivo de obtener una herramienta de detección integral desechable.

La fabricación del chip con microfluídica integrada puede separarse en dos etapas diferentes:

- Funcionalización superficial del electrodo serigrafiado.
- Posterior encapsulación e integración de los componentes fluídicos.

### **Funcionalización superficial**

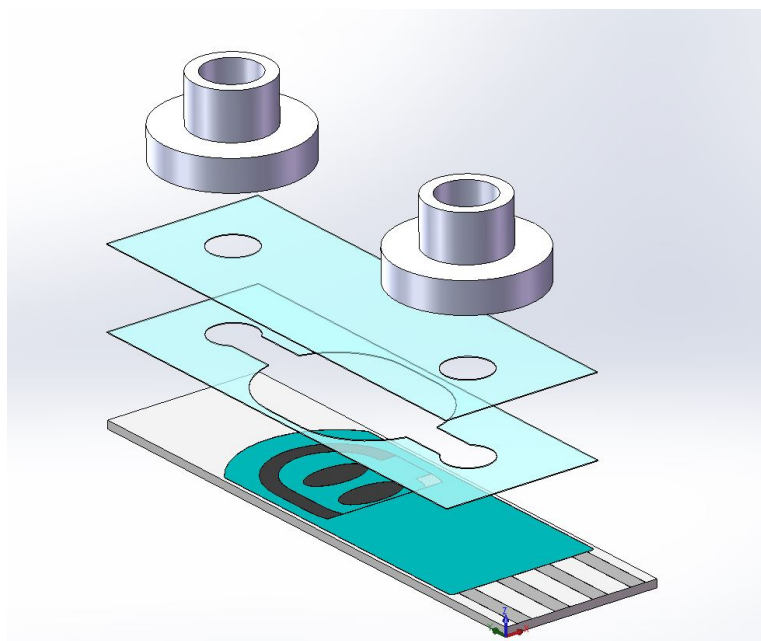
La funcionalización de la superficie de carbono de los SPCE es un paso previo a la encapsulación. Esta se ha realizado siguiendo dos métodos diferentes, una adsorción física directa y una unión covalente por medio de 4-ABA; ambos han sido detallados en la Sección 3.3.4 y cuya eficiencia se compara y discute en la Sección 4.1.1.2 de este mismo capítulo.

### **Integración de los componentes fluídicos**

La integración fluídica para completar el chip final se ha realizado partiendo de un SPCE funcionalizado. Se ha optado por un diseño sencillo, que consta de un entrada fluídica, una cámara situada sobre la zona sensora (electrodos) y una salida fluídica.

La materialización de este diseño se ha realizado por superposición de diferentes películas poliméricas, cada una recortada con un motivo diferente. La suma ordenada de las diferentes capas permite realizar construcciones tridimensionales (*origami fluidics*) que constituyen los diferentes elementos fluídicos del chip final (cámara, canales, entradas y salidas). Para el corte de estos motivos se ha hecho uso de un plotter de corte Silhouette CAMEO™ y el programa de diseño asistido por ordenador (CAD) AutoCAD 2013. Este sistema, permite el control preciso de los motivos y por extensión de todas las dimensiones de la fluídica (longitud de canales, volumen de la cámara, etc.) así como una alta reproducibilidad de los mismos.

En esta aplicación concreta, la fluídica se ha compuesto superponiendo dos capas diferentes. La primera, situada en contacto con la cara superior del SPCE, es una lámina de poliéster recubierta por ambos lados de un adhesivo sensible a la presión (PSA, ARcare 90445, Applied Research) de 80  $\mu\text{m}$  de grosor. Esta lámina tiene recortados el contorno de la cámara y los canales de entrada y salida, creando un volumen efectivo de la cámara de 8  $\mu\text{L}$ . Sobre esta primera capa se coloca una segunda, una película transparente de acetato (CG3420, 3M) que contiene los puertos de entrada y salida recortados.



**Figura 4.1:** Despiece de los diferentes componentes que constituyen el chip desechable final, en este caso sobre un electrodo dual de Dropsens (DRP-C1110).

Sobre esta última película se adhieren los conectores Luer de entrada y salida, de forma coincidente con los puertos recortados en esta capa. A través de estos conectores, mediante el empleo de una jeringa de 1 mL se cargan los diferentes reactivos y/o muestras en la cámara del chip. El proceso completo de fabricación está ilustrado en la Figura 4.1.

#### 4.1.1.2. Elección de la estrategia de funcionalización superficial óptima

Una adecuada funcionalización superficial es indispensable a la hora de desarrollar un biosensor, ya que la sensibilidad y la especificidad del reconocimiento molecular depende directamente de ella. Tal y como se detalla en la Sección 3.3.4, la funcionalización superficial de los SPCE se ha llevado a cabo por medio de dos métodos diferentes:

- En primer lugar, se ha realizado una *unión covalente* de los anticuerpos de captura, para la cual se modifica la superficie del WE con 4-ABA. Para inmovilizar el 4-ABA sobre la superficie del electrodo, se oxida el grupo amino del 4-ABA a su catión radical por medio de la aplicación de un potencial (voltametría) para unirlo a la superficie de carbono del electrodo. De esta reacción resulta un enlace covalente carbono-nitrógeno, anclando el 4-ABA al WE de forma muy estable. Posteriormente, se une

la molécula de reconocimiento por medio de la química EDC/NHS. Esta funcionalización superficial da lugar a uniones sólidas, a través de un proceso elaborado.

- En segundo lugar, se ha estudiado una *adsorción física* (o fisisorción) de los anticuerpos, para lo cual se coloca una gota de la disolución de la molécula de reconocimiento sobre el WE y se deja secar en condiciones ambientales controladas. Este método da lugar a una unión más débil que la anterior, por la naturaleza de los enlaces de Van der Waals que se forman, a través de un procedimiento mucho más sencillo.

Estas dos estrategias se evaluaron comparando la capacidad de cada una de las superficies funcionalizadas de capturar TNF $\alpha$  específicamente. Se funcionalizaron diferentes lotes de electrodos con una solución de 10  $\mu\text{g/mL}$  de antiTNF $\alpha$  siguiendo los protocolos detallados en la Sección 3.3.4.

A continuación, se midieron las respuestas amperométricas obtenidas al medir una disolución estándar de 100 ng/ml de TNF $\alpha$ , siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.3.5. Al mismo tiempo, también se midieron las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de TNF $\alpha$  (negativos), con objeto de evaluar la discriminación de cada una de las estrategias y las posibles adsorciones inespecíficas sobre cada una de las superficies..

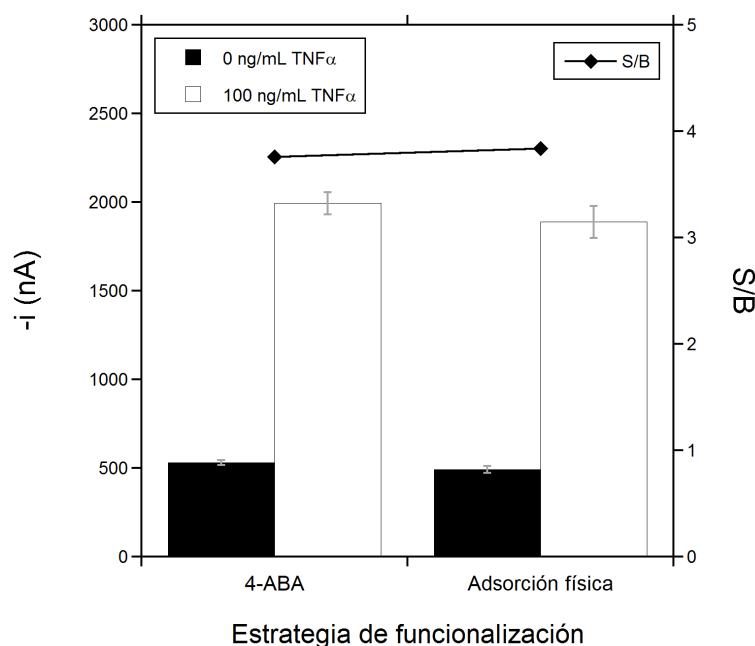
Los resultados de ambos ensayos, representados en la Figura 4.2, demuestran un comportamiento analítico similar de ambos métodos. En principio, se espera una mayor estabilidad de los anticuerpos unidos covalentemente, que podrían regenerarse y utilizarse durante varios ciclos de medida. Sin embargo, como este sistema de detección se plantea como un biosensor desechable, de un solo uso, la mayor estabilidad y la posibilidad de regeneración pasan a un segundo plano y priman la rapidez y sencillez del proceso de funcionalización, y por tanto, debido a que los resultados son comparables en términos de sensibilidad y discriminación, se ha optado por el método de la *fisisorción* para el resto de los ensayos realizados en este formato de sensor integrado desechable.

La unión covalente de los anticuerpos de reconocimiento se reserva para otras aplicaciones en las que se requiera una mayor estabilidad de la funcionalización: inmunoensayos más complejos o casos en los que haga falta realizar algún tipo de regeneración superficial.

#### 4.1.1.3. Optimización de las variables experimentales

##### Combinación de pasos en la formación del inmunocomplejo

En muchos casos, la complejidad de las medidas en el campo de los biosensores radica en la necesidad de realizar múltiples pasos de forma secuen-

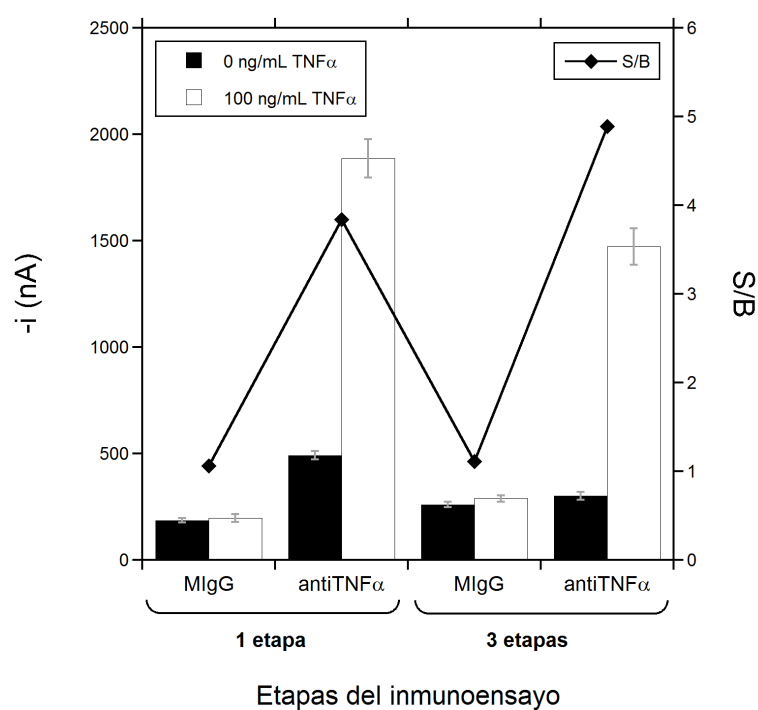


**Figura 4.2:** Efecto de la estrategia de funcionalización empleada para unir a la superficie del SPCE los anticuerpos de captura antiTNF $\alpha$ . Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

cial, principalmente a la hora de formar el inmunocomplejo. Desde este punto de vista, la combinación de las diferentes etapas que componen este proceso (captura del analito, unión del anticuerpo secundario y marcado enzimático) en un solo paso resulta de de tremendo interés, ya que posibilita el desarrollo de un sistema de detección mucho más rápido y sencillo.

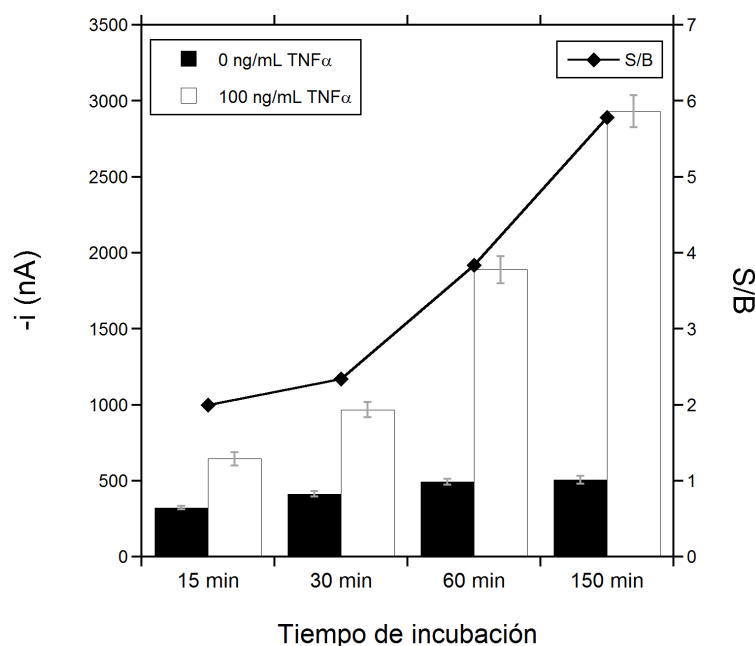
Siguiendo esta idea, se ha comparado el rendimiento de la detección siguiendo un esquema secuencial tradicional (paso a paso) de construcción del inmunocomplejo, con el ensayo en un solo paso (detallado en la Sección 3.3.5). Para ello, se han realizado para cada una de las estrategias anteriores, ensayos tanto con muestras positivas (disolución estándar de 100 ng/mL TNF $\alpha$ ) como negativas (0 ng/mL TNF $\alpha$ ). Los resultados obtenidos se representan en la Figura 4.3.

Tal y como puede observarse en la Figura 4.3, mientras que los negativos ofrecen unos valores similares, para las muestras positivas, la señal obtenida en el ensayo unificado es un 22 % mayor. Esta disminución de la señal en el formato basado en etapas secuenciales puede atribuirse a una menor eficiencia de los procesos de reconocimiento cuando se trabaja con los inmunoreactivos inmovilizados sobre el sustrato electrodo en comparación con la que ocurre en disolución homogénea en la que se minimizan las limitaciones por difusión o por impedimentos estéricos.



**Figura 4.3:** Comparación de los resultados obtenidos realizando el inmunoensayo en etapas secuenciales o en una única etapa. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).





**Figura 4.4:** Señales obtenidas, mediante un ensayo en un solo paso, para diferentes tiempos de incubación. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ )

En base a estos resultados se ha optado por realizar el inmunoensayo en una única etapa, que además de permitir una discriminación ligeramente superior, simplifica el protocolo de ensayo y reduce significativamente el tiempo de ensayo, factores de gran relevancia en un dispositivo desarrollado para diagnóstico rápido.

### Tiempo de incubación

Precisamente, una de las características más importantes en un sensor como el planteado, es el tiempo de medida. Este tiempo, viene directamente condicionado por la cinética específica de cada sistema antígeno-anticuerpo y por tanto resulta un parámetro esencial del sensor y su optimización repercute directamente en la sensibilidad del mismo. Para el estudio de la influencia de este parámetro en la sensibilidad de la detección, se han realizado medidas con muestras positivas (100 ng/mL  $\text{TNF}\alpha$ ) y negativas (0 ng/mL  $\text{TNF}\alpha$ ) empleando diferentes tiempos de incubación, comprendidos entre 15 y 150 minutos. El formato del inmunoensayo, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, se ha realizado en un solo paso y sobre un chip funcionalizado mediante adsorción física de los anticuerpos de captura anti $\text{TNF}\alpha$ .

Los resultados, ilustrados en la Figura 4.4, muestran un claro aumento de la respuesta amperométrica obtenida con el tiempo de incubación. En cualquier

caso, cabe destacar que aun empleados periodos de incubación muy cortos, el sensor discrimina perfectamente la presencia de 100 ng/ml de TNF $\alpha$ .

En el intervalo de tiempos estudiado, la respuesta amperométrica aumenta linealmente con el tiempo de incubación. Esto ocurre por tratarse de un proceso que está limitado por el transporte de masa (el analito, junto con el resto de elementos del inmunocomplejo, tardan en llegar a la superficie), en el que la superficie sensora está lejos de saturarse. En este escenario, en el que hay anticuerpos de captura libres en exceso, el aumento de los tiempos de contacto repercute directamente en la cantidad de analito capturado. Siguiendo la tendencia marcada desde el inicio y buscando una situación de compromiso entre una alta sensibilidad y un tiempo de ensayo atractivo desde un punto de vista práctico, se ha seleccionado un tiempo de 60 min para esta incubación.

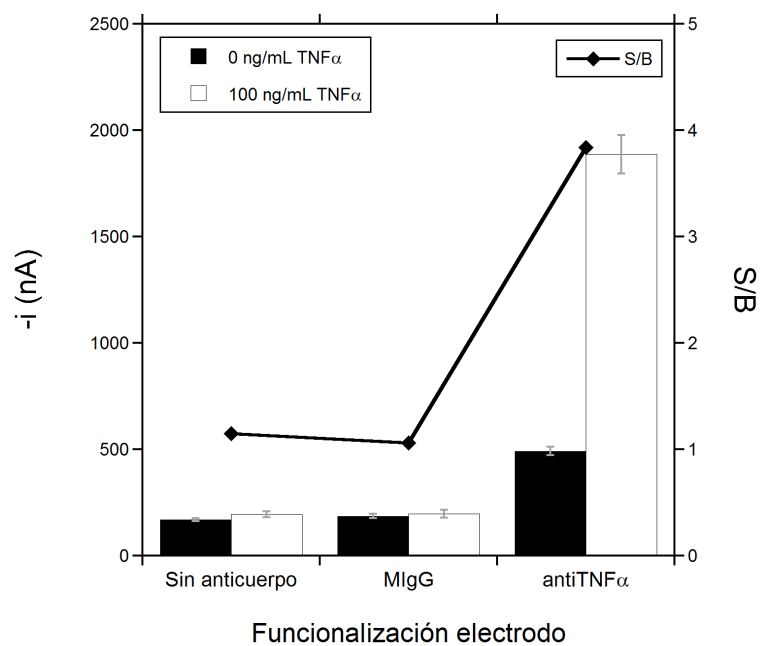
#### 4.1.1.4. Especificidad del sensor

Aunque en cualquier sensor la especificidad es una característica esencial, lo es especialmente cuando la muestra que se quiere analizar es una muestra compleja, como es el suero. Por tanto, el estudio de la especificidad del sensor es un proceso necesario para poder valorar la aplicabilidad práctica del sistema desarrollado.

Para estudiar esta característica, se ha funcionalizado la superficie de los electrodos con anticuerpos de captura genéricos no específicos: MIgG. Pese a ser estructuralmente similares a los anticuerpos antiTNF $\alpha$  de ratón, ambos difieren en su zona de reconocimiento específico, de manera que constituyen la manera más real de estudiar la especificidad del sensor. En la comparativa, se realizaron medidas con chips funcionalizados con antiTNF $\alpha$  específicos, con MIgG no específicos y unos terceros en los que no se inmovilizó ningún anticuerpo (la superficie del WE sí que fue bloqueada con BSA para evitar la adsorción física del analito a la superficie del electrodo). Estas dos últimas superficies se han empleado para establecer un punto de referencia y de esta manera poder valorar la cantidad de TNF $\alpha$  que se une a la superficie sensora del chip de manera no específica.

En la Figura 4.5 se representan los resultados de las medidas mencionadas, tanto para muestras positivas (con un contenido de 100 ng/mL de TNF $\alpha$ ) y negativas (disoluciones estándares de un contenido de 0 ng/mL de TNF $\alpha$ ). Cabe destacar en primer lugar que la señal de las dos superficies de referencia no ofrece ninguna diferencia entre las muestras positivas y las negativas.

Esta característica puede evaluarse de manera sencilla en cada medida realizada empleando electrodos serigrafiados duales, con dos WE, en el que uno de los dos electrodos se emplea como referencia en tiempo real, corrigiendo para cada medida posibles uniones no específicas. Esta característica resul-



**Figura 4.5:** Medidas realizadas con muestras positivas y negativas sobre un sensor específico (funcionalizado con anticuerpos de captura específicos antiTNF $\alpha$ ) y dos superficies sensoras no específicas (no funcionalizadas y funcionalizada con anticuerpos no específicos), con el objetivo de valorar la especificidad del sensor. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

ta especialmente ventajosa en un dispositivo de medida desechable y de bajo coste como el que se presenta, ya que al contar con un sistema de referencia integrado, pueden evitarse los costosos procesos de calibrado requeridos por otros sistemas.

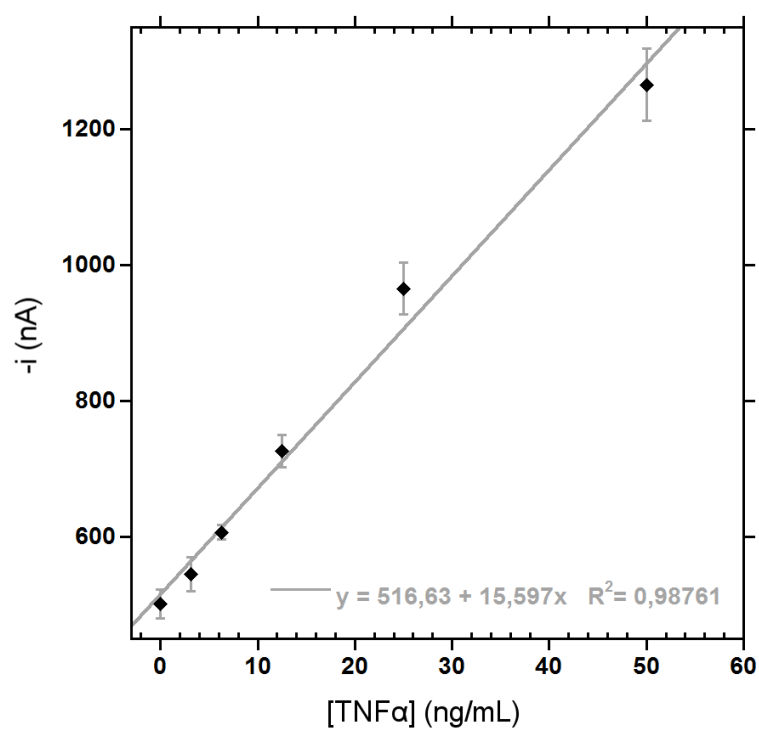
Al mismo tiempo, puede observarse también la elevada selectividad de los anticuerpos empleados para el desarrollo del inmunosensor, lo que lo hace especialmente prometedor y atractivo para análisis de muestras complejas. Estas dos características, unidas, hacen de este sensor una opción ideal en tests rápidos dirigidos a amplios sectores poblacionales, en los que el coste, manteniendo el compromiso con la sensibilidad y la especificidad, resulta un factor determinante.

#### 4.1.1.5. Caracterización del comportamiento analítico del sensor

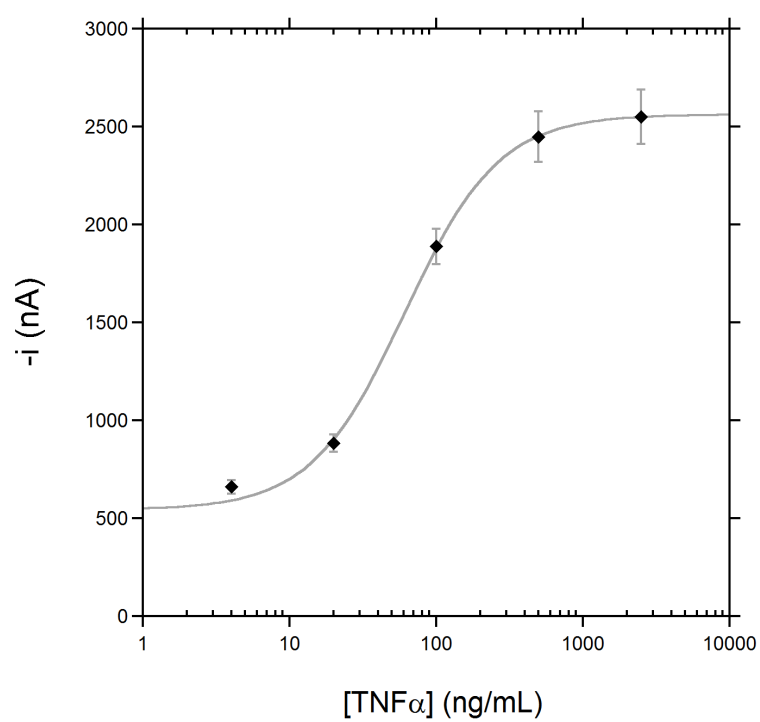
En las secciones anteriores, se han analizado diferentes variables y parámetros y su influencia en el sensor, hasta llegar a una configuración óptima del mismo, seleccionada teniendo en cuenta criterios de sensibilidad, especificidad, tiempo de medida y coste. Para caracterizar el rendimiento analítico de esta configuración, se ha construido una curva de calibración analizando disoluciones estándares con concentraciones crecientes de  $\text{TNF}\alpha$ , preparadas en PBS.

La Figura 4.6 muestra los resultados obtenidos, resultando un intervalo lineal de determinación de 3,25 ng/mL a 50 ng/mL de  $\text{TNF}\alpha$  (Coeficiente de Correlación ( $R^2$ ) = 0,987). Con el objetivo de calcular el LD del sensor más rigurosamente, se han realizado 5 repeticiones ( $n=5$ ) del blanco (solución con un contenido de 0 ng/mL de  $\text{TNF}\alpha$ ). Los valores estimados para el LD y el LQ (de acuerdo con los criterios descritos en la Sección 3.4.2) resultaron de 4,1 y 13,7 ng/ml, respectivamente.

Pese a lo deseable que resulta trabajar en el rango lineal de un sensor, para su completa caracterización resulta interesante ampliar este rango de concentraciones. Con este objetivo, se ha extendido la curva de calibración original, aumentando la concentración máxima de  $\text{TNF}\alpha$  hasta los 2500 ng/mL, donde se comienza a observar una clara pérdida de la linealidad. Siguiendo el proceso descrito en detalle en la Sección 3.4.1, se han ajustado los datos experimentales de esta curva de calibración extendida, basándose en un modelo de interacción biomolecular 1:1. De este ajuste se ha obtenido una Constante de Equilibrio ( $K_D$ ) de 1,1 nM. Este valor de  $K_D$  para el  $\text{TNF}\alpha$ , que está en situado en un rango de valores similar al obtenido en otros inmunoensayos (Martínez-Perdiguero et al., 2014b, 76 pM), confirma la elevada afinidad del anticuerpo inmovilizado por el antígeno y está de acuerdo con el buen comportamiento analítico demostrado por el sensor.



**Figura 4.6:** Curva de calibración obtenida en el rango lineal de concentraciones. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



**Figura 4.7:** Curva de calibración en un rango más amplio de concentraciones. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).

	Suero nº1	Suero nº2	Suero nº3
TNF $\alpha$ añadido (ng/mL)	0	20,0	100,0
TNF $\alpha$ detectado (ng/mL)	< LD	18,3 $\pm$ 0,7	94 $\pm$ 6
Recuperación (%)	-	91,5	94,3

**Tabla 4.1:** Concentraciones calculadas para tres muestras de suero con contenidos diferentes de TNF $\alpha$ . Cada una de las medidas está replicada tres veces (n=3).

#### 4.1.1.6. Medidas en suero

Como se ha comentado en varias ocasiones, el formato de chip desechable propuesto está dirigido a la realización de tests rápidos. En este contexto, la capacidad del sensor para analizar muestras complejas es imprescindible. Para el estudio del comportamiento del sensor ante muestras complejas y reales, se optó por emplear suero humano real, tanto por la complejidad intrínseca de la muestra, como por el interés concreto para su aplicación en detección de TNF $\alpha$ . Se han empleado muestras de suero humano real suplementado con TNF $\alpha$ . Previamente se comprobó por medio de un ELISA estándar que las muestras de suero analizadas tenían un contenido endógeno de TNF $\alpha$  indetectable ( $\leq 5$  pg/ml).

En una primera aproximación, se estudió una muestra apenas sin diluir, en la que se reservó únicamente un 5 % del volumen final para realizar el suplemento de TNF $\alpha$ , biotina-antiTNF $\alpha$  y SAV-AP. Para esta dilución al 95 % de suero, dada la naturaleza compleja del mismo, no se obtuvieron buenos resultados debido a una altísima cantidad de interacciones inespecíficas que enmascaraban cualquier señal del TNF $\alpha$  a determinar. En vista de estos resultados se decidió aplicar una dilución previa a la muestra con el fin de minimizar el efecto matriz observado.

Al diluir el suero hasta el 25 %, la señal específica correspondiente a la presencia de TNF $\alpha$  emerge, permitiendo su cuantificación directa. Es necesario indicar que al existir la necesidad de diluir la muestra, la concentración efectiva de analito lo hace en consonancia. Los resultados experimentales demuestran que cuando se trabaja con la muestra del suero al 25 %, el efecto matriz desaparece y se puede determinar la concentración de TNF $\alpha$  en el mismo por simple interpolación en el calibrado realizado con estándares de TNF $\alpha$ . En la Tabla 4.1 se recogen los resultados obtenidos para tres muestras de suero contaminadas con niveles diferentes, realizándose tres réplicas de cada una de las determinaciones y estimando las recuperaciones como se ha descrito en la Sección 3.4.2.3. Como puede observarse, se obtuvieron recuperaciones superiores al 90 % en todos los casos, lo que demuestra claramente la utilidad de este chip desechable para el análisis de muestras reales.

En cualquier caso, para valorar estos resultados, resulta interesante hacer una comparativa con otros estudios en los que se realiza una detección electroquímica de  $\text{TNF}\alpha$  en suero, por ejemplo el mismo autor de este trabajo (Eletxigerra et al., 2014), Bettazzi et al. (2012), Weng et al. (2013b), Li et al. (2012b) o Mazloun-Ardakani et al. (2014).

El autor de este trabajo (Eletxigerra et al. (2014) y Sección 4.1.2) y Bettazzi et al. (2012) desarrollaron diferentes inmunoensayos basados en el uso de micropartículas magnéticas, pero empleando dos técnicas de medida diferentes: amperometría en el primer caso y DPV en el segundo, obteniendo unos LD de 5,8 y 44 pg/mL respectivamente. Weng et al. (2013b) propone un sensor *label-free* (sin marcador) basado en un sistema transductor  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -quitosano-glutaraldehído y con electrodos de carbono vitrificado, obteniendo un LD de 10 pg/mL. Li et al. (2012b) detectan concentraciones de 2 pg/mL de  $\text{TNF}\alpha$  mediante el empleo de nanopartículas de  $\text{CeO}_2$  funcionalizadas con azul de prusia y realizando satisfactoriamente tests de recuperación en suero. Por otro lado, Mazloun-Ardakani et al. (2014) desarrollan dos inmunoensayos electroquímicos diferentes sobre electrodos serigrafiados de grafito modificados con poli(ácido antranílico), obteniendo un LD de 3,2 pg/mL.

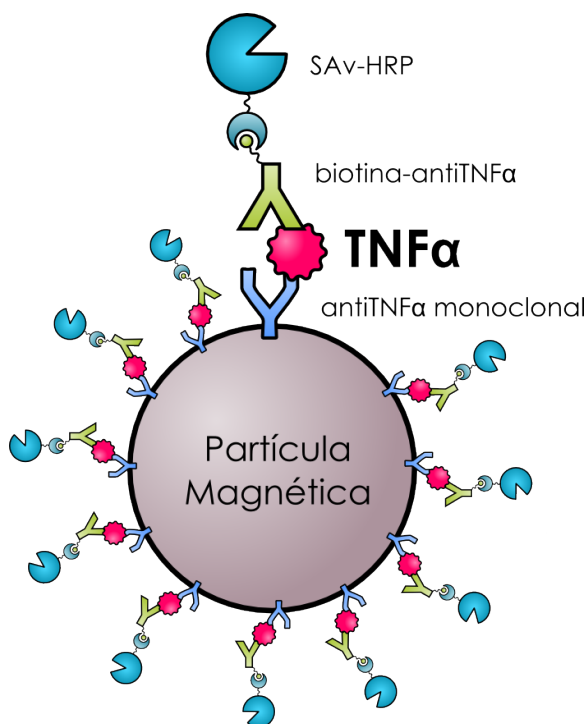
A pesar de la elevada sensibilidad de los anteriormente mencionados sensores, hay que tener en cuenta que todos ellos requieren o bien protocolos laboriosos con varias operaciones manuales o consumibles excesivamente caros como para considerar su aplicación en un entorno real. Al mismo tiempo, la integración de estos sensores en un dispositivo de medida automático no queda resuelta, complicando su aplicación como tests rápidos.

#### **4.1.2. Magnetoinmunosensor amperométrico para la determinación de $\text{TNF}\alpha$**

En la sección anterior se ha descrito el desarrollo de un biosensor, aplicado a la detección de  $\text{TNF}\alpha$ , en el que se han priorizado factores como la simplicidad de la medida y la integración en un chip desechable, potenciando todas aquellas propiedades características de un sensor dirigido a la realización de tests rápidos. Al tomar esta dirección, es necesario hacer ciertas concesiones a otros atributos muy importantes de un sensor, como son la alta especificidad y un LD extremadamente bajo, que en ciertas aplicaciones resultan preferentes.

Siguiendo esta línea, se ha desarrollado un biosensor, también aplicado a la detección de  $\text{TNF}\alpha$ , pero enfocado a obtener un LD lo más bajo posible. En cualquier caso, es importante destacar que la detección electroquímica es de por sí, además de sensible, rápida, de bajo coste y miniaturizable y por lo tanto, estas propiedades y posibilidades tan importantes a la hora de encontrar una aplicación real para un sensor, siguen estando muy presentes.

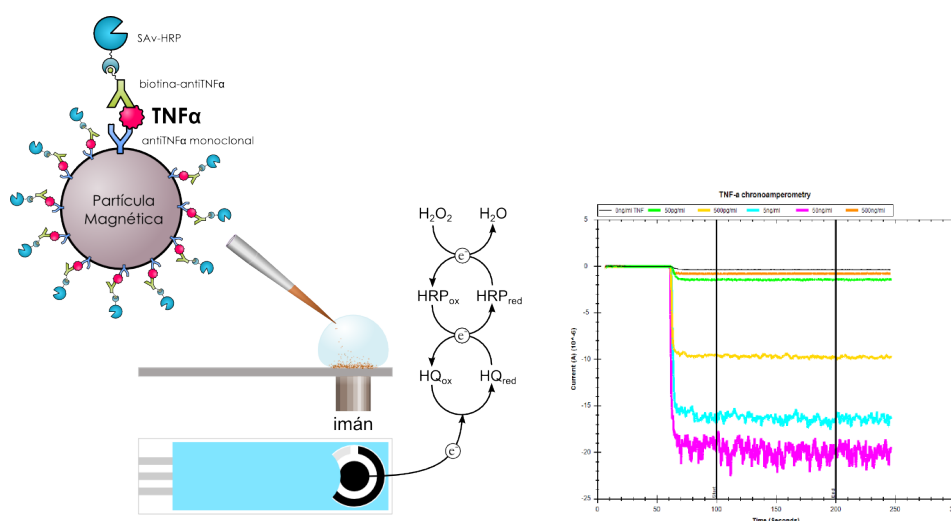




**Figura 4.8:** Inmunocomplejo tipo sándwich para la detección de TNF $\alpha$  formado sobre una HOOC-MBs.

Para la realización de este biosensor, en lugar de funcionalizar directamente la superficie de los electrodos, se ha hecho uso de Partículas Magnéticas (MBs), con el propósito de aumentar la sensibilidad del sensor y al mismo tiempo mejorar su rendimiento en el análisis de muestras complejas. La configuración básica de este inmunoensayo, consiste en funcionalizar HOOC-MBs con un anticuerpo de captura antiTNF $\alpha$  y emplear estas MBs para capturar de manera selectiva y eficiente el TNF $\alpha$  en solución. Mediante esta estrategia se mejora significativamente la eficiencia del reconocimiento del antígeno, en primer lugar porque la superficie de contacto aumenta enormemente, y en segundo lugar porque se reduce la influencia de factores tan limitantes como la difusión o el transporte de masa. Una vez capturado el analito, este se marca enzimáticamente empleando un anticuerpo secundario (ver Figura 4.8).

Para la cuantificación del analito, se capturan magnéticamente las MBs con los inmunocomplejos tipo sándwich marcados con HRP sobre un SPCE para poder realizar la medida amperométrica final. El procedimiento detallado se describe en la Sección 3.3.3 y se ilustra en la Figura 4.9.



**Figura 4.9:** Esquema seguido para la determinación de TNF $\alpha$  empleando un inmunoensayo tipo sándwich implementado sobre la superficie de MBs y transducción amperométrica sobre un SPCE.

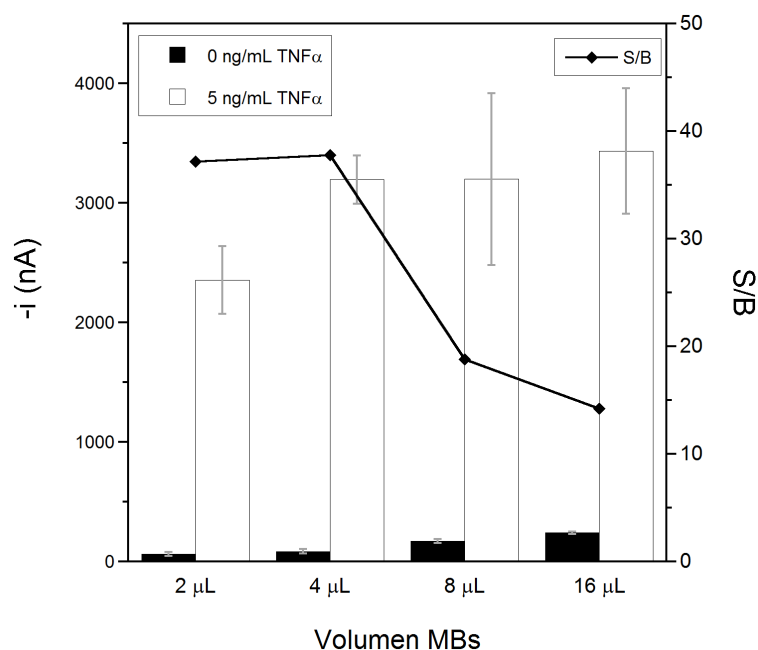
#### 4.1.2.1. Optimización de las variables experimentales

Con el objetivo de desarrollar una metodología lo más sensible y selectiva posible, se han optimizado todas aquellas variables experimentales involucradas en la fabricación del inmunosensor. Para seleccionar todas estas variables se ha tomado como criterio de selección la relación señal/ruido (S/B) entre las respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones estándares que contienen 0 (N) y 5 ng/mL (S) de TNF $\alpha$ .

#### Cantidad de HOOC-MBs

En primer lugar se seleccionó la cantidad óptima de HOOC-MBs empleada para cada medida. Como puede verse en la Figura 4.10, se ensayaron valores comprendidos entre 2 y 16  $\mu$ L de la solución comercial de HOOC-MBs (a 30 mg/mL o  $\approx 2 \cdot 10^9$  partículas por mL) por ensayo. Como era de esperar, a mayores cantidades de HOOC-MBs, la señal aumenta, llegando a un máximo cerca de los 4  $\mu$ L. A partir de este valor, la relación S/B disminuye significativamente, lo que puede atribuirse al aumento más significativo de las respuestas no específicas en comparación con las específicas y a la naturaleza no conductora de las MBs que impide la transferencia electrónica cuando se capturan en grandes cantidades sobre la superficie del electrodo de trabajo.

También conviene destacar que se ha observado una peor reproducibilidad de las medidas cuando se han empleado altas cantidades de HOOC-MBs, probablemente por la dificultad de dispersarlas uniformemente sobre la superfi-



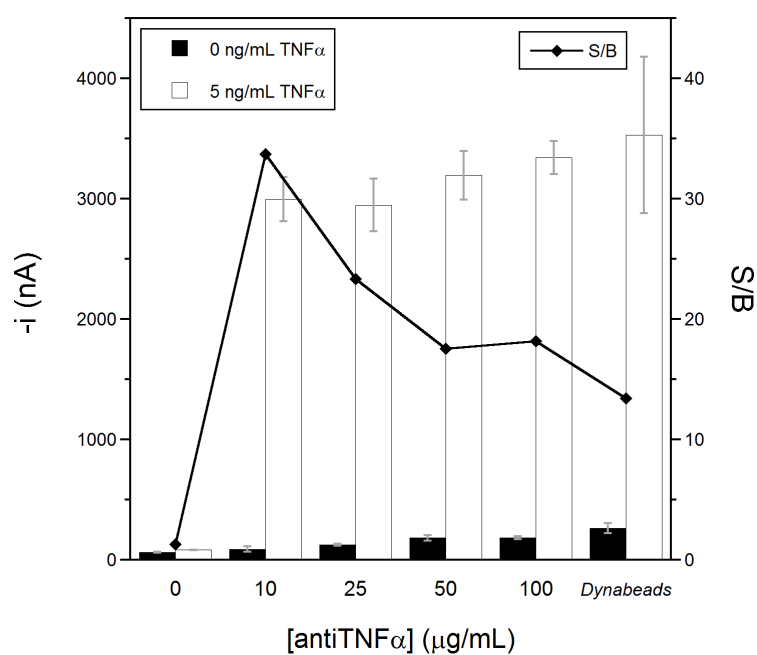
**Figura 4.10:** Efecto de la cantidad de HOOC-MBs en las respuestas amperométricas para estándares que contienen 0 y 5 ng/mL de TNF $\alpha$  y en la relación S/B obtenida. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

cie sensora. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó un volumen de 4  $\mu$ L de la suspensión original como valor óptimo para estudios posteriores.

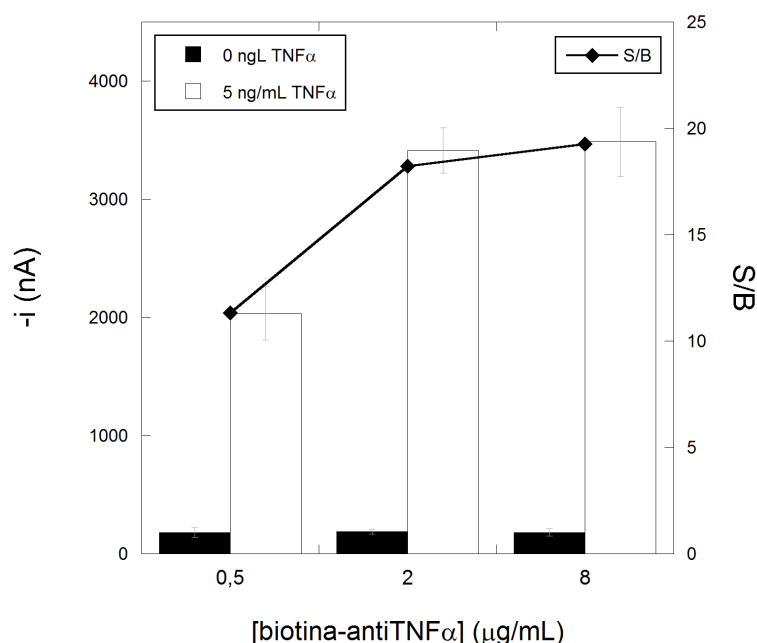
### Concentración del anticuerpo de captura

Un factor determinante en el rendimiento analítico del sensor, ya sea en su sensibilidad o en su especificidad, es la calidad de la funcionalización de la superficie de las HOOC-MBs. A la hora de obtener una adecuada funcionalización de las MBs para el inmunoreconocimiento, la concentración del anticuerpo de captura resulta determinante. El fabricante de las HOOC-MBs (Dyna-beads) recomienda realizar la funcionalización de las mismas en una solución de anticuerpo de captura de 100  $\mu$ g/mL para ELISAs. Partiendo de este valor, se han ensayado concentraciones comprendidas entre 0 y 100  $\mu$ g/mL, incluyendo como control una serie en la que se ha medido la respuesta obtenida al analizar un estándar preparado en ausencia de TNF $\alpha$  y otra serie tomada como referencia en la que se ha seguido el protocolo recomendado por el fabricante.

En la Figura 4.11 puede comprobarse como la relación S/B aumenta con la concentración de anticuerpo de captura hasta los 10  $\mu$ g/mL y disminuye para concentraciones superiores lo que puede atribuirse a la estabilización de las



**Figura 4.11:** Efecto de la concentración de antiTNF $\alpha$  en las respuestas amperométricas para el inmunoensayo construido sobre HOOC-MBs, para estándares que contienen 0 y 5 ng/mL de TNF $\alpha$  y en la relación S/B obtenida. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



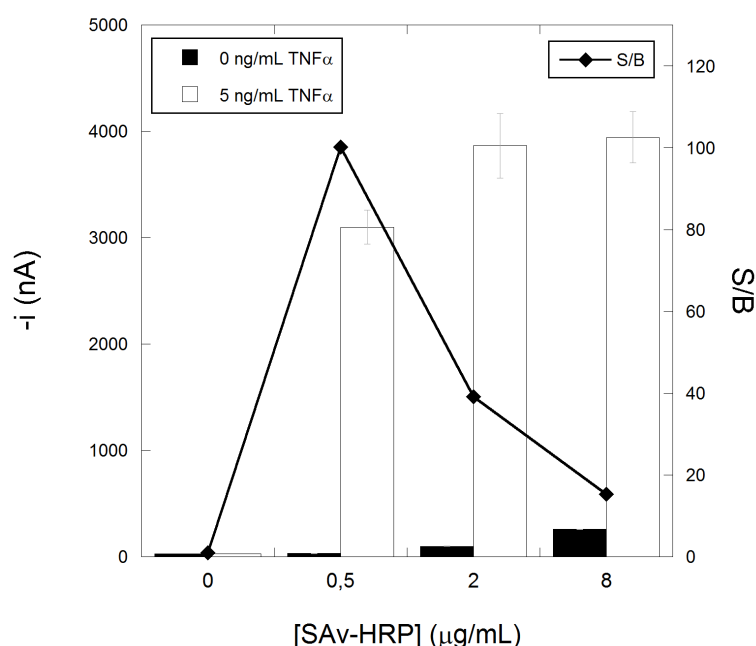
**Figura 4.12:** Efecto de la concentración de biotina-antiTNF $\alpha$  en las respuestas amperométricas obtenidas para estándares que contienen 0 y 5 ng/mL de TNF $\alpha$  y en la relación S/B obtenida. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

respuestas específicas y al aumento progresivo de las inespecíficas (obtenidas en ausencia de proteína diana). De acuerdo con estos resultados se ha seleccionado como óptima una concentración de antiTNF $\alpha$  de  $10 \mu\text{g/mL}$ , que además de ofrecer la mejor relación S/B reduce 10 veces el gasto de anticuerpo de captura respecto al protocolo recomendado por el fabricante.

### Concentración del anticuerpo de detección

Junto con la concentración del anticuerpo primario o de captura, la correcta elección de la concentración del anticuerpo secundario o de detección tiene un papel muy importante en la detección, ya que participa directamente en la formación del inmunocomplejo y el marcaje del antígeno capturado, que es, al fin y al cabo, la piedra angular del sensor. Para la elección del valor óptimo de biotina-antiTNF $\alpha$ , se ensayaron concentraciones comprendidas entre los 0,5 y los  $8 \mu\text{g/mL}$ . Los resultados se muestran en la Figura 4.12.

En primer lugar, cabe destacar que no se observan diferencias en las respuestas amperométricas inespecíficas con la concentración de anticuerpo de detección. La comparación de las señales específicas demuestra que estas au-



**Figura 4.13:** Efecto de la concentración de SAV-HRP en las respuestas amperométricas para el inmunoensayo construido sobre HOOC-MBs, para muestras con un contenido de 0 y 5 ng/mL de  $\text{TNF}\alpha$ . Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20 \text{ V}$  vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).

mentan con la concentración de anticuerpo de detección hasta un valor de  $2 \mu\text{g/mL}$ , valor a partir del cual se estabilizan. Teniendo en cuenta estos resultados y como compromiso entre sensibilidad y coste de ensayo, se seleccionó como óptima una concentración de anticuerpo de detección de  $2 \mu\text{g/mL}$ .

### Concentración del marcador enzimático

Al igual que el resto los inmunoreactivos que se requieren para el inmuno-complejo tipo sándwich de  $\text{TNF}\alpha$ , la concentración del trazador enzimático se seleccionó con objeto de conseguir la mejor sensibilidad del ensayo sin comprometer su especificidad. Los resultados obtenidos variando la concentración de SAV-HRP entre 0 y 8 ng/mL (mostrados en la Figura 4.13) demuestran que tanto las señales específicas como las inespecíficas aumentan progresivamente con la cantidad de anticuerpo de detección. La tendencia observada para las relaciones S/B demuestra que el valor óptimo se obtiene trabajando con 500 ng/mL, por lo que se seleccionó esta concentración de SAV-HRP para estudios posteriores.

### Tiempos de incubación

El tiempo de incubación de cada una de las etapas involucradas en el inmunoensayo es un parámetro esencial a optimizar con objeto de conseguir el mejor comportamiento analítico del sensor en el menor tiempo de ensayo. Es importante destacar en este punto que aunque en general un mayor tiempo de incubación supone un aumento en las respuestas específicas, en ocasiones también lo hacen las inespecíficas lo que se traduce en una peor discriminación entre la presencia y ausencia de analito diana empleando mayores tiempos de incubación.

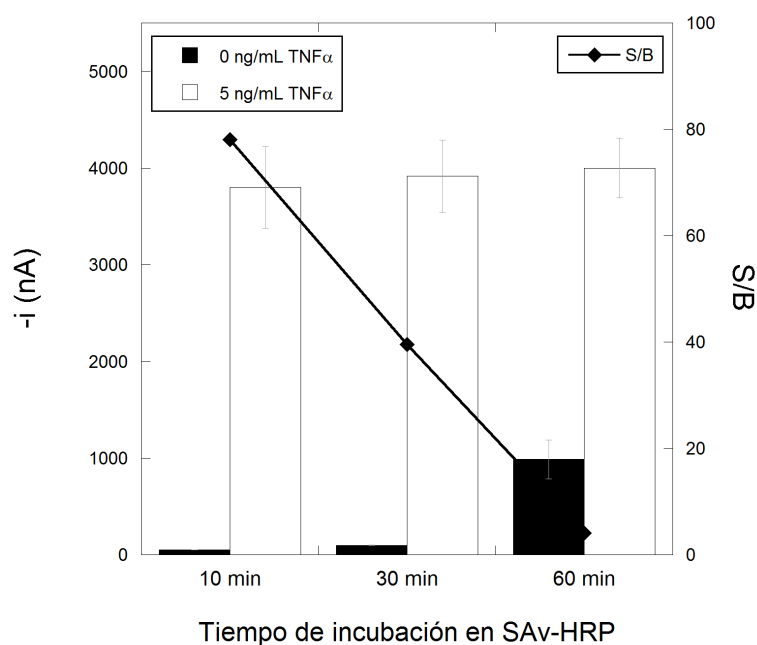
Asimismo, el coste en términos de tiempo de ensayo está directamente relacionado con la duración de la incubación y por tanto no conviene excederse en este tiempo, con el objetivo de mantener el interés práctico del sensor. Se ha observado que el incremento de los tiempos de incubación del anticuerpo primario (antiTNF $\alpha$ ) y secundario (biotina–antiTNF $\alpha$ ) efectivamente influyen positivamente en la sensibilidad del sensor. Sin embargo, para que estas mejoras sean lo suficientemente significativas, la duración de las incubaciones ha de ser excesivamente larga (varias horas), comprometiendo el interés práctico del sistema de medida. Teniendo esto en cuenta, se ha seleccionado un tiempo de incubación de 1 h para las etapas que involucran a los anticuerpos de captura y de detección.

También se ha observado que el aumento del tiempo de incubación en la disolución del trazador enzimático tiene una influencia muy importante en la magnitud de las respuestas inespecíficas y mucho menor en las específicas (ver Figura 4.14). Como compromiso entre mejor discriminación (mayor relación S/B) y menor tiempo de ensayo se seleccionó un tiempo de ensayo de 10 min. El empleo de tiempos de incubación inferiores suponía una mayor irreproducibilidad en las medidas.

La razón principal de que el trazador enzimático requiera mucho menor tiempo de incubación que los anticuerpos de captura y de detección debe atribuirse a la altísima afinidad existente en la pareja biotina — Estreptavidina (SAv) (Michael Green, 1990). Con una  $K_D$  de  $4 \times 10^{-14}$  M, es la unión biológica no covalente más fuerte conocida. Hay que destacar que esta etapa añade un paso de especificidad extra al inmunoensayo sin alargar significativamente el tiempo de ensayo total.

### Resumen de los parámetros óptimos

En la Tabla 4.2 se resumen todas las variables optimizadas, incluyendo el rango de valores ensayados y el valor final seleccionado para cada una de ellas. Salvo que se especifique lo contrario, los valores seleccionados son los empleados para la obtención de todos los resultados que se presenten a continuación.



**Figura 4.14:** Efecto del tiempo de incubación de la SAV-HRP en las respuestas amperométricas obtenidas para estándares que contienen 0 y 5 ng/mL de  $\text{TNF}\alpha$  y en la relación S/B obtenida. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).

Variable experimental	Rango evaluado	Valor seleccionado
Volumen HOOC-MBs, $\mu\text{L}$	2,0–16	4
[anti $\text{TNF}\alpha$ ], $\mu\text{g/mL}$	10–100	10
[biotina-anti $\text{TNF}\alpha$ ], $\mu\text{g/mL}$	0,5–8	2
[SAV-HRP], $\mu\text{g/mL}$	0,5–8	2
$t_{\text{Incubación SAV-HRP}}$ , min	10–60	10

**Tabla 4.2:** Variables experimentales optimizadas para el magnetoinmunoensayo para la determinación de  $\text{TNF}\alpha$ .



#### 4.1.2.2. Especificidad del inmunoensayo

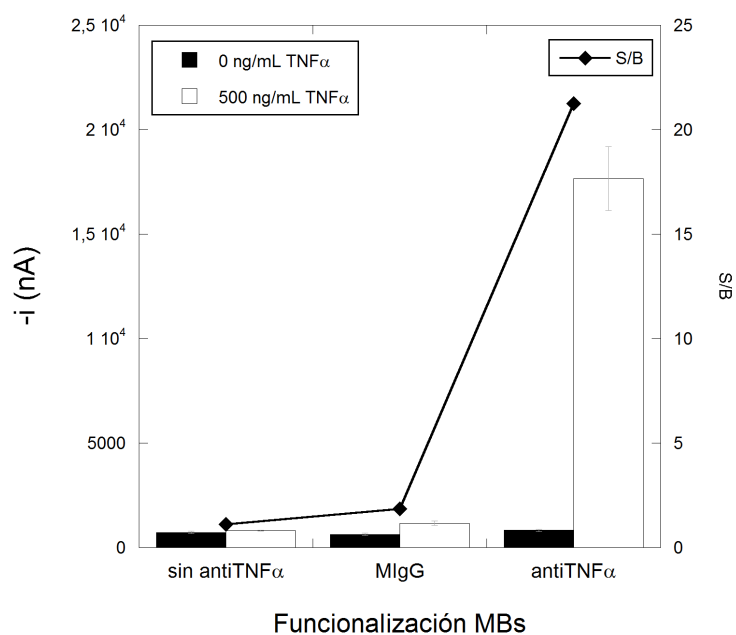
La posible existencia de uniones no específicas del analito ( $\text{TNF}\alpha$ ), del anticuerpo de detección secundario (biotina-anti $\text{TNF}\alpha$ ) o el marcador enzimático (SAv-HRP) directamente sobre las HOOC-MBs sin que medie ninguna reacción antígeno-anticuerpo específica, puede alterar considerablemente el resultado de la detección y condicionar en gran medida la fiabilidad del mismo. Para evaluar este fenómeno, se han comparado las señales amperométricas obtenidas al analizar disoluciones estándares que contienen 0 y 500 ng/mL de  $\text{TNF}\alpha$  usando MBs funcionalizadas específicamente (con anti $\text{TNF}\alpha$ ) y no específicamente (con MIgG por un lado y sin anticuerpo de captura por el otro), de manera análoga al procedimiento realizado para el sensor integrado (ver Sección 4.1.1.4).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.15. Al contrario que con el sensor integrado (ver Sección 4.1.1.4), las señales negativas (contenido de 0 ng/mL de  $\text{TNF}\alpha$ ) varían dependiendo de la funcionalización llevada a cabo. En concreto, la señal negativa para las MBs funcionalizadas para la captura específica de  $\text{TNF}\alpha$ , resulta algo mayor que en los otros dos casos. Por esta razón, y aunque cualitativamente resulta evidente la especificidad de la detección, se han calculado y comparado las relaciones S/B (positivo/negativo) para cada uno de los casos expuestos con el objetivo de valorar cuantitativamente esta propiedad con mayor exactitud. En la comparativa de estas relaciones, se ha observado que es 13 veces mayor cuando las MBs están funcionalizadas con el anticuerpo de captura específico, lo que corrobora la implementación de un magnetoinmunoensayo tipo sándwich para la determinación de  $\text{TNF}\alpha$ .

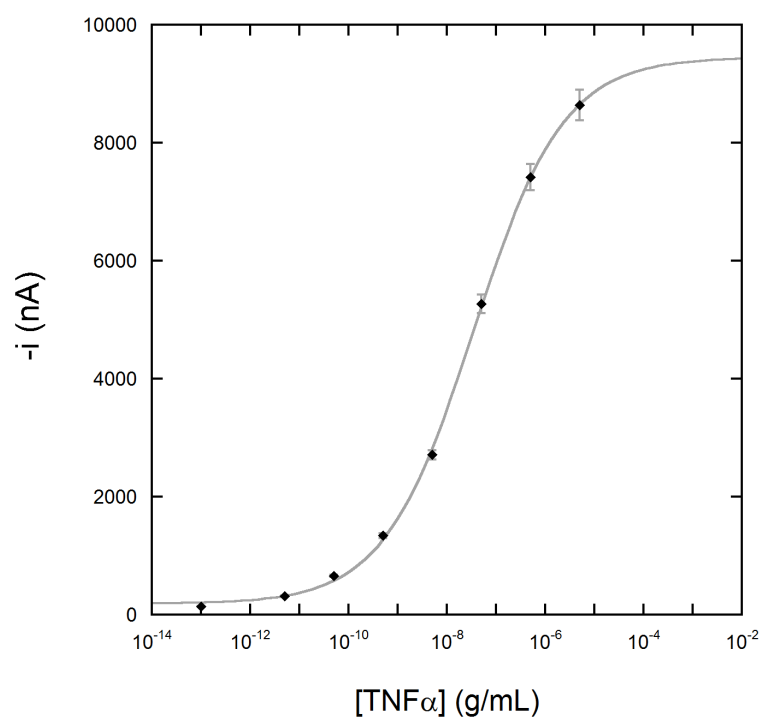
#### 4.1.2.3. Características analíticas

Para evaluar las características analíticas del inmunoensayo, se ha construido en primer lugar una curva de calibración con disoluciones estándar de  $\text{TNF}\alpha$  con concentraciones comprendidas entre los 5 pg/mL y los 5  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Figura 4.16 puede observarse la forma sigmoidal que toma la **curva de calibración**, lo que está de acuerdo con un modelo de interacción molecular 1:1. Aplicando el modelo de afinidad definido en la Sección 3.4.1 (Ecuación 3.2), se ha estimado una  $K_D$  de  $\approx 600$  pM, concentración a la cual se obtiene el 50 % de la señal máxima (Cooper, 2009). Esta  $K_D$ , que concuerda con la cinética de la interacción  $\text{TNF}\alpha$ -anti $\text{TNF}\alpha$  presentada en otros estudios (p. ej. Martínez-Perdiguero et al. (2014b)), tiene un valor muy bajo, indicando la elevada afinidad de esta interacción biomolecular, que se confirmará en las siguientes secciones por la elevada sensibilidad y selectividad proporcionada por el inmunoensayo. Siguiendo la metodología descrita en la Sección 3.4.2.1, se ha calculado un LD de 2,0 pg/mL (es decir, 0,15 pg de  $\text{TNF}\alpha$  en 75  $\mu\text{L}$  de



**Figura 4.15:** Evaluación de adsorciones inespecíficas. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas para estándares que contienen 0 y 500 ng/mL de TNFα y relación S/B obtenida realizando el inmunoensayo con MBs funcionalizadas de forma diferente: sin anticuerpo de captura, con MIgG no específico y con antiTNFα específica. Cada una de las medidas está replicada tres veces (n=3).



**Figura 4.16:** Curva de calibración construída a partir de disoluciones estándar de  $\text{TNF}\alpha$  preparadas en PBST pH 7,5. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20$  V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).

muestra o 36 fM), un valor de concentración que se encuentra en un rango de interés clínico ( $\leq 10$  pg/mL), lo que pone de manifiesto la posible aplicabilidad del biosensor propuesto en un entorno clínico real.

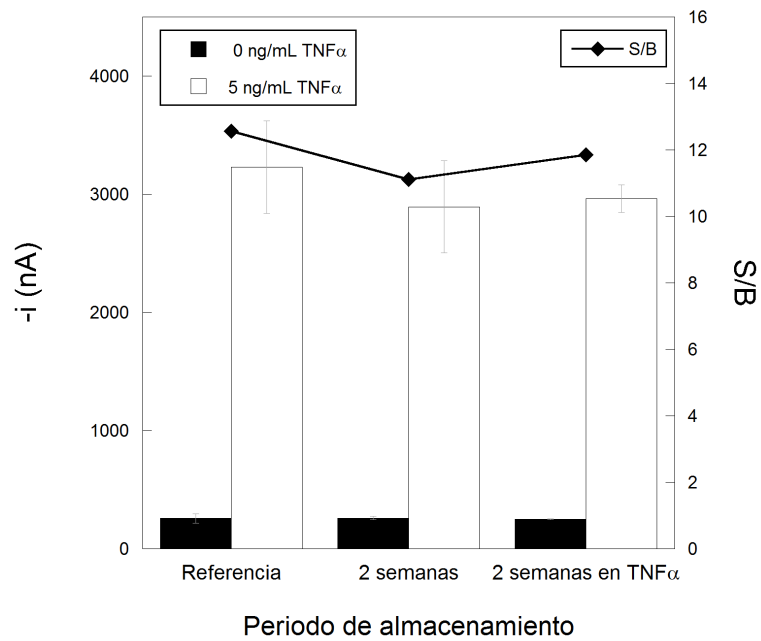
Por otro lado, también se ha evaluado la **reproducibilidad** de las medidas obtenidas mediante diferentes inmunoensayos preparados de la misma manera, tanto en el mismo día como en días diferentes. Para ello se han estimado los valores de RSD entre las respuestas amperométricas obtenidas en ensayos intradía e interdía para estándares de TNF $\alpha$  de 5 ng/ml, empleando la metodología descrita en la Sección 3.4.2.2. Se obtuvieron valores de RSD del 5.7 % para determinaciones realizadas el mismo día (n=5) y del 7.5 % para determinaciones realizadas en días diferentes (n=10).

Estos resultados confirman que el procedimiento completo de realización del inmunoensayo, incluyendo todas las etapas de modificación de las MBs y de medida amperométrica, es altamente reproducible, lo que resulta imprescindible para asegurar la fiabilidad de la determinación.

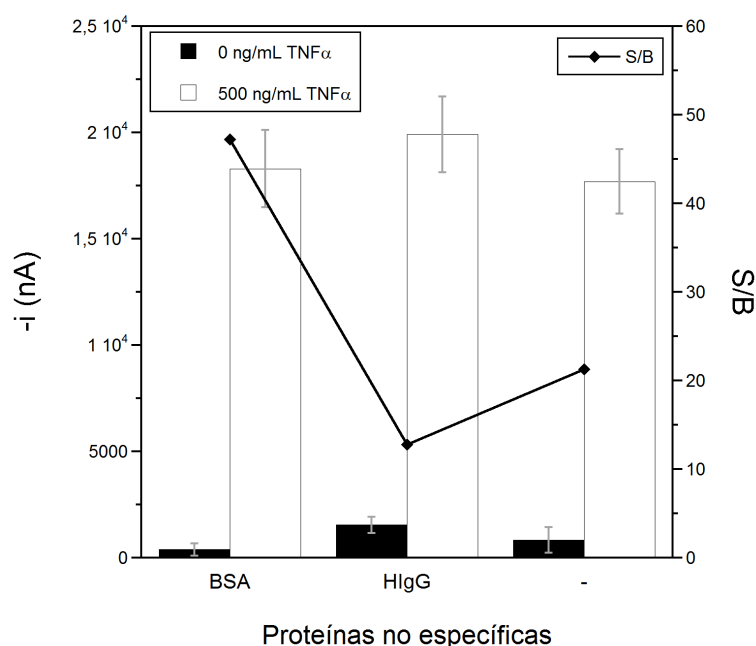
Con vistas a reducir el tiempo total de ensayo y la futura implementación de esta metodología en la rutina hospitalaria también se evaluó la posibilidad de almacenar las MBs modificadas con el anticuerpo de captura estimándose el tiempo durante el cual las mismas proporcionan una respuesta que no difiere significativamente de la obtenida en el momento de su fabricación. Desde el punto de vista práctico, representa una gran ventaja, ya que abre amplias posibilidades como poder llevar las MBs funcionalizadas al lugar de extracción de la muestra, para poder hacer la detección in-situ.

Para realizar este estudio se han preparado 3 lotes de MBs funcionalizadas con antiTNF $\alpha$ . Se controla la respuesta amperométrica proporcionada para estándares de TNF $\alpha$  de 0 y 5 ng/ml de TNF $\alpha$  y se hace lo mismo con los otros dos lotes tras su almacenamiento a 4°C en PBST filtrado o en disoluciones estándares de 0 y 5 ng/mL de TNF $\alpha$  durante 2 semanas. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 4.17, demuestran la elevada estabilidad de los bioconjugados de MBs preparados, que pueden prepararse y almacenarse al menos durante 2 semanas sin pérdida significativa de sensibilidad.

Como puede comprobarse, la estabilidad de la funcionalización es muy alta, y el rendimiento de la detección permanece inalterado después de 2 semanas de almacenamiento, lo cual demuestra que las MBs podrían ser funcionalizadas y posteriormente empleadas sin ningún tipo de pérdida de rendimiento. Situaciones en las que por conveniencia resulta ventajoso preparar grandes cantidades de MBs funcionalizadas para su posterior uso, también pueden beneficiarse de esta propiedad.



**Figura 4.17:** Estabilidad de almacenamiento de las MBs modificadas con antiTNF $\alpha$  controlando las respuestas amperométricas proporcionadas para disoluciones estándares de TNF $\alpha$  de 0 y 5 ng/ml por un lote recién preparado y dos equivalentes almacenados en PBST filtrado y en las disoluciones estándares de TNF $\alpha$  a 4°C durante 2 semanas. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



**Figura 4.18:** Selectividad del inmunoensayo frente a elevadas concentraciones de proteínas no específicas. Respuestas amperométricas obtenidas con el inmunoensayo desarrollado para disoluciones estándares de 0 y 5 ng/ml de TNF $\alpha$  preparadas en ausencia y en presencia de 5 mg/mL de BSA y 1 mg/mL de HlgG. También se ha representado el cociente entre estos dos valores para calcular la relación S/B. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

### Selectividad del inmunosensor

Para evaluar la selectividad del sensor se ha estudiado el efecto de la presencia de dos **proteínas no específicas**, como son el BSA y el HlgG, ambas a muy altas concentraciones (5 y 1 mg/mL respectivamente) en la determinación de TNF $\alpha$ . Para ello se han comparado las respuestas amperométricas obtenidas con el magnetoinmunoensayo desarrollado para disoluciones estándares de 0 y 500 ng/ml de TNF $\alpha$  preparadas en ausencia y en presencia de cada una de estas proteínas a las concentraciones indicadas. Como puede deducirse de los resultados mostrados en la Figura 4.18, la presencia de estas proteínas a los niveles especificados no interfiere en la determinación de TNF $\alpha$ . De hecho, resulta destacable el efecto beneficioso de la presencia de BSA en la mejora significativa de la relación S/B como consecuencia de la minimización de las respuestas no específicas en su presencia.

La elevada selectividad observada, que puede atribuirse al empleo de un formato de ensayo tipo sándwich en el que se combinan las especificidades del anticuerpo de captura y de detección y a la elevada afinidad de los anticuerpos

comerciales empleados, demostrada por la baja  $K_D$  (estimada en la Sección 4.1.2.3), minimiza la posibilidad de falsos negativos, requisito indispensable en una herramienta de diagnóstico fiable.

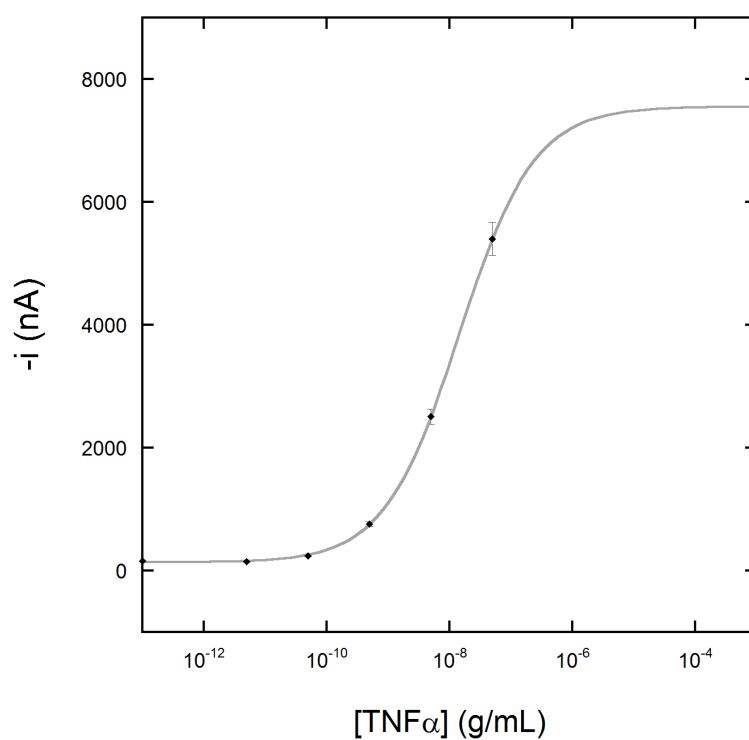
### **Análisis de muestras de suero humano**

La alta sensibilidad exhibida por el sensor, junto con la buena selectividad del mismo, invitan a demostrar la aplicabilidad del método de determinación desarrollado para el **análisis de muestras complejas**. En este caso, se ha decidido evaluar la utilidad del inmunoensayo para la cuantificación de  $\text{TNF}\alpha$  en suero humano comercial (Sigma-Aldrich).

En primer lugar, se ha construido una curva de calibración empleando suero humano, suplementado con concentraciones crecientes de un estándar de  $\text{TNF}\alpha$ , dando lugar a la Figura 4.19. A partir de la curva de calibración obtenida en suero, se ha estimado un LD de 43 pg/mL, una concentración que bien siendo baja, aún se sitúa un orden de magnitud superior al obtenido en PBST, lo que demuestra la existencia de efecto matriz en esta muestra. Además, esta concentración mínima detectable es superior al valor de corte de 10 pg/mL (de Kossodo et al., 1995; Borrayo et al., 2014; Papadopoulou et al., 2010; Correia et al., 2007) establecido en suero para la mayoría de las enfermedades. Estos resultados limitan la utilidad práctica del mismo para el análisis de este tipo de muestras. Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del sensor en el análisis de suero, y así ampliar la aplicabilidad del mismo a un entorno clínico y poder emplearla como herramienta de diagnóstico, se ha llevado a cabo una optimización del inmunoensayo más profunda, enfocada a obtener en suero también un LD aún menor.

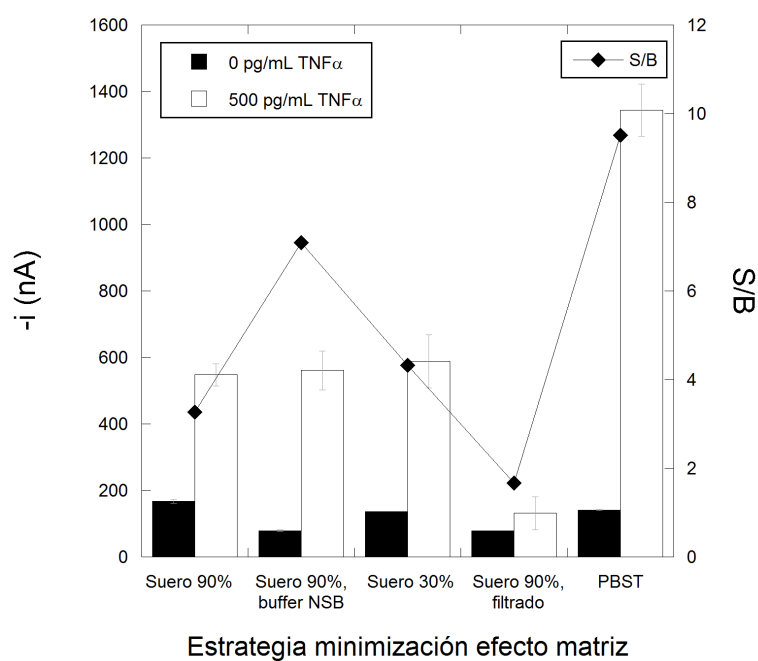
Con objeto de minimizar el efecto matriz y mejorar el LD que proporciona el magnetoinmunoensayo en muestras de suero se ha comparado la discriminación obtenida para muestras de suero sin suplementar y suplementadas con 500 pg/ml de  $\text{TNF}\alpha$  después de aplicar distintos tratamientos y diluciones al suero en diferentes medios. Como puede observarse en los resultados mostrados en la Figura 4.20 estos estudios no ofrecieron una mejora significativa en la relación S/B, por lo que se decidió evaluar otras alternativas para mejorar el LD en muestras de suero humano.

Para complementar la reducción de las uniones no específicas obtenida a través de la suplementación del suero, se han empleado otras estrategias, como la dilución del suero en PBST hasta un 30 % o el filtrado de la muestra a través de un filtro de centrifugado de 100 kDa. Sin embargo, estos métodos no ofrecieron un aumento apreciable en la relación S/B de la determinación y por tanto se descartaron.

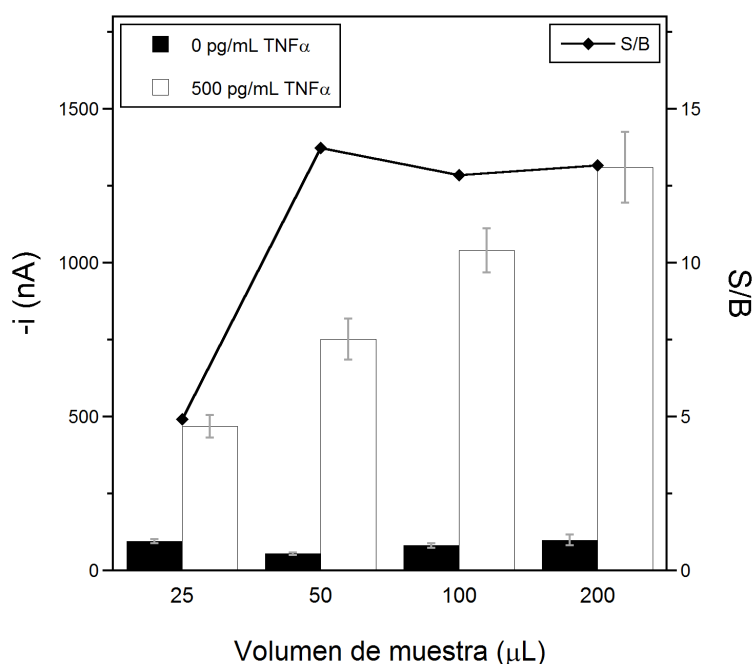


**Figura 4.19:** Curva de calibración obtenida para muestras de suero sin diluir suplementadas con concentraciones crecientes de  $TNF\alpha$ . Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).





**Figura 4.20:** Evaluación de distintos protocolos y diluciones de la muestra de suero en distintos medios. Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas para muestras de suero sin suplementar y suplementadas con  $\text{TNF}\alpha$  después de aplicar cada uno de los protocolos ensayados. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20 \text{ V}$  vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).



**Figura 4.21:** Efecto del volumen de muestra empleado en el inmunoensayo en las señales amperométricas obtenidas para muestras de suero sin contaminar y contaminadas con 500 pg/mL de  $\text{TNF}\alpha$ . Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20 \text{ V}$  vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).

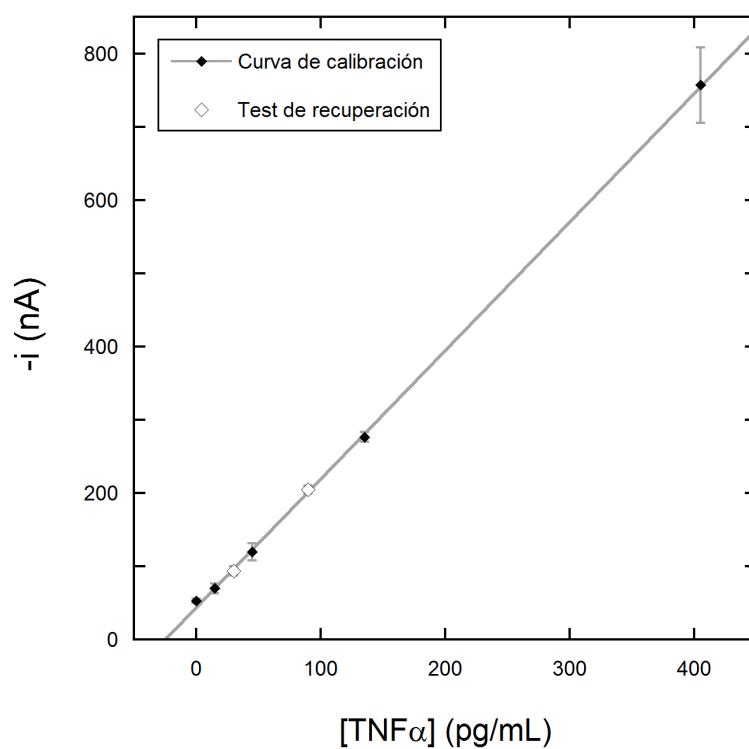
Otro factor que puede tener un peso muy importante en el LD es el volumen de muestra empleado. Para estudiar la influencia de este parámetro se ha comparado la relación S/B obtenida para muestras de suero sin suplementar y suplementadas con 500 pg/ml de  $\text{TNF}\alpha$  variando el volumen de muestra empleado en la incubación entre los 25 y los 200  $\mu\text{L}$ . Como puede observarse en la Figura 4.21, mientras que la intensidad registrada para las muestras con  $\text{TNF}\alpha$  aumenta de manera lineal con el volumen de incubación, no se observa una variación significativa para las respuestas amperométricas obtenidas para las muestras sin suplementar. Teniendo en cuenta por un lado la variación de la relación S/B y por otro que la cantidad de muestra es un recurso limitado del paciente que conviene minimizar con el objetivo de que la técnica sea lo menos invasiva posible, se decidió trabajar con un volumen de muestra de 100  $\mu\text{L}$ .

Teniendo en cuenta estos últimos resultados se construyó una nueva curva de calibración para muestras de suero suplementadas con concentraciones de  $\text{TNF}\alpha$  comprendidas entre 0 y 400 pg/mL, trabajando con un volumen de incubación de 100  $\mu\text{L}$  y con las muestras diluidas al 90 % (resevando el 10 % restante para la adición de  $\text{TNF}\alpha$ , NaCl, Tween y BSA) (Figura 4.22). El análisis

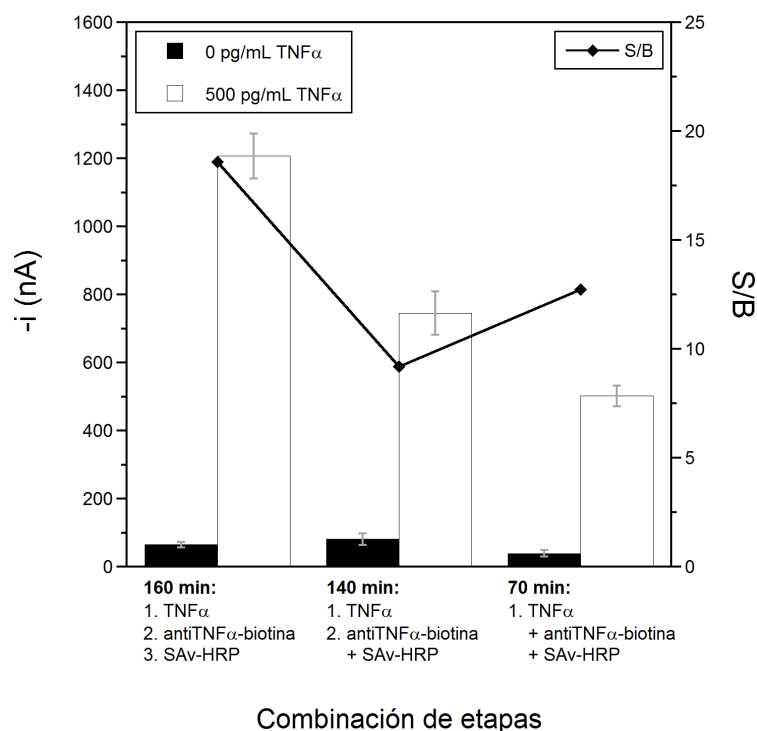
se ha centrado en este tramo por estar situado al mismo tiempo en una zona lineal (ver Figura 4.19 para un rango más amplio) y en unas concentraciones clínicamente relevantes. A través de la curva de calibración lineal obtenida en este rango (ver Figura 4.22) se ha obtenido un LD de 5,8 pg/mL, lo que teniendo en cuenta que se está analizando la muestra prácticamente sin diluir y que el valor de corte establecido para el nivel sérico de TNF $\alpha$  es de 10 pg/mL, permite asegurar que el magnetoinmunoensayo desarrollado es adecuado para la determinación de TNF $\alpha$  en concentraciones clínicamente relevantes. Es importante resaltar también que el LD obtenido es aproximadamente 8 veces inferior al que proporciona el único magnetoinmunoensayo descrito previamente para la determinación de TNF $\alpha$ , mostrando un rendimiento excepcional en el análisis de muestras de suero. Estas magníficas características analíticas se deben, por un lado al uso de las MBs (que mediante los diferentes pasos de separación magnética y resuspensión permiten una eficiente captura del analito en muestras complejas) y por el otro al proceso de (re)optimización llevado a cabo hasta dar con la solución adecuada para minimizar las uniones no específicas en suero.

Finalmente, se ha demostrado la fiabilidad del sensor para la determinación en muestras de suero humano reales (los ensayos anteriores han sido realizadas en un suero comercial (Sigma-Aldrich), mucho más estandarizado y uniforme). La determinación de la concentración de TNF $\alpha$  en muestras reales se ha realizado en suero de pacientes con un nivel basal de TNF $\alpha$  indetectable, que se han suplementado con volúmenes diferentes de un estándar de TNF $\alpha$  para que la concentración final en las mismas sea de 30 y 90 pg/mL de TNF $\alpha$ . La cuantificación se ha llevado a cabo interpolando los valores de corriente medidos para estas dos muestras en la curva de calibración mostrada en la Figura 4.22. De esta interpolación (con tres repeticiones de cada concentración), se han calculado concentraciones de  $28 \pm 4$  pg/mL y  $91 \pm 3$  pg/mL, que corresponden a valores de recuperación del  $94 \pm 11$  % y  $102 \pm 10$  % respectivamente. Estos resultados demuestran claramente la utilidad del magnetoinmunoensayo desarrollado para la determinación directa de TNF $\alpha$  en **suero humano real**, pese a la complejidad implícita en el análisis de este tipo de muestras biológicas.

Es importante destacar también el reducido **tiempo de ensayo total** que representa el análisis, que es de 160 min, partiendo de MBs funcionalizadas con el antiTNF $\alpha$ . Hay que tener en cuenta que esta duración es la del ensayo optimizado para obtener la máxima sensibilidad y que existen diferentes estrategias para reducir este tiempo de ensayo, lo cual puede ser especialmente útil en aplicaciones en las que el tiempo de ensayo es crítico y el LD no es un factor tan determinante. En este trabajo se han explorado dos estrategias, que han sido, por un lado, la reducción de los tiempos de incubación y por el otro lado la combinación de las diferentes etapas que involucra la formación del inmunocomplejo tipo sándwich. Esta última vía se ha explorando, en primer lugar



**Figura 4.22:** Curva de calibración en el tramo lineal, construida a partir de muestras de suero diluidas al 90% suplementadas con distintos niveles de TNF $\alpha$ . Valores obtenidos para las respuestas amperométricas proporcionadas por muestras reales de suero humano suplementadas con 20 y 90 pg/mL de TNF $\alpha$  ( $\diamond$ ). Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



**Figura 4.23:** Efecto de la combinación de las diferentes etapas de incubación requeridas por el magnetoinmunoensayo y por tanto del tiempo total de ensayo en la sensibilidad final obtenida. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

combinando los pasos de incubación de biotina-antiTNF $\alpha$  y SAV-HRP, lo cual se traduce en un tiempo de análisis total de 140 min y supone una reducción del 38 % en la sensibilidad del ensayo en comparación con la obtenida en 3 pasos secuenciales. En segundo lugar, se ha empleado una aproximación más directa, realizando la incubación de todos los componentes en un solo paso (incubación de 60 min de las MBs funcionalizadas con la muestra, el biotina-antiTNF $\alpha$  y la SAV-HRP al mismo tiempo), protocolo con el que se observa una sensibilidad un 59 % inferior.

De los resultados de estos ensayos (comparados en la 4.23) puede concluirse que aunque la sensibilidad del ensayo disminuye significativamente con la reducción en el tiempo de ensayo, estas aproximaciones pueden resultar atractivas para el análisis de muestras con mayor contenido de TNF $\alpha$  o para realizar un cribado previo de muestras que tengan contenido endógeno muy superior al valor de corte establecido en suero.

Finalmente, el magnetoinmunoensayo propuesto en este trabajo para la determinación de TNF $\alpha$  se ha comparado con otras técnicas descritas en la

literatura para la determinación de  $\text{TNF}\alpha$  en muestras complejas (Tabla 4.3). Varios de estos estudios, basados también en medios de detección electroquímicos, proporcionan unos LD muy bajos.

Debido a la baja concentración basal de  $\text{TNF}\alpha$  junto con la dificultad añadida de tener que lidiar con el efecto matriz que se presenta en el análisis de muestras complejas, solo unos pocos trabajos han obtenido resultados de interés en la detección de  $\text{TNF}\alpha$  en sangre o suero: Martínez-Perdigüero et al. (2014a) desarrollaron un biosensor óptico, basado tecnología de SPR para la detección de  $\text{TNF}\alpha$  en muestras de suero al 25 %, por medio de un inmunoensayo y posterior amplificación por medio de Nanopartículas de oro (AuNPs), obteniendo un LD de 54,4 pg/mL. Por otro lado, Luo et al. (2005a) realizaron ensayos de recuperación en suero a través de quimioluminiscencia. Liu et al. (2013) han desarrollado un aptasensor electroquímico empleando azul de metileno como marcador y Voltamperometría de Onda Cuadrada (SWV) como técnica de medida, para lograr un LD de 10 ng/mL en sangre. Asimismo, Weng et al. (2013a) han propuesto un sensor *label free* basado en medidas de CV empleando Ferricianuro de Potasio ( $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ ) y Li et al. (2012a) han usado nanopartículas de óxido de cerio funcionalizadas con Azul de Prusia junto con medidas de CV.

En contraste con la mayoría de las soluciones recogidas en la Tabla 4.3, conviene enfatizar en las posibilidades de automatización y miniaturización del método propuesto en este trabajo, que junto con los reducidos tiempos de ensayo y su simplicidad, presenta múltiples ventajas frente al resto de las alternativas.

Metodología	Técnica	Muestra	Rango de concentraciones (pg/mL)	LD (pg/mL)	Tiempo de ensayo	Referencia
Amplificación con AuNPs	SPR	Suero humano al 25 %	50–300	54.4	20 min	Martinez-Perdiguero et al. (2014b)
Quimioluminiscencia mejorada	ECL	Suero bovino al 50 %	9–312	1	≈ 15 h	Luo et al. (2005b)
Aptameros marcados con azul de metileno	EQ (SWV)	Sangre humana	10000–100000	10000	≈ 1 h	Liu et al. (2013)
Nanohilos de péptidos autoensamblados modificados con ferroceno y Nanopilares de oro funcionalizados con glucosa oxidasa	SPR	Suero humano	10–10000	2	≈ 3 h	Sun et al. (2013)
Sin marcado ( <i>label-free</i> )	EIS	Medio de cultivo	1–100	1	≈ 3 h	Pui et al. (2013)
Sin marcado ( <i>label-free</i> )	EQ (CV)	Suero humano	20–34000	10	≈ 5 h	Weng et al. (2013a)
Nanopartículas de óxido de cerio	EQ (CA)	Suero humano	5–5000	2	≈ 4 h	Li et al. (2012a)
MBs	EQ (DPV)	Suero	100–5000	44	≈ 6 h	Bettazzi et al. (2012)
Nanoesferas funcionalizadas con AP	EQ	Suero humano al 25 %	20–200000	10	≈ 3 h	Yin et al. (2011)
Magnetoinmunoensayo	EQ (CA)	Suero humano	15–405	5.8	1–3 h	Este trabajo

**Tabla 4.3:** Comparativa de diferentes métodos descritos para la determinación de TNF $\alpha$ .

## 4.2. Determinación de biomarcadores de cáncer de mama

En la Sección anterior (4.1), se ha presentado el desarrollo de un biosensor electroquímico para la detección de  $\text{TNF}\alpha$ , un importante biomarcador de procesos inflamatorios. Su detección se ha llevado a cabo en suero humano real, obteniendo una sensibilidad y selectividad destacables. Con ello se ha demostrado la capacidad del magnetoinmunosensor propuesto en este trabajo como herramienta de diagnóstico en enfermedades en las que a causa de la cascada inflamatoria se produce un nivel anormalmente elevado de  $\text{TNF}\alpha$  en el organismo, como pueden ser la enfermedad de Chron o la artritis reumatoide.

En la mayoría de las ocasiones, sin embargo, los biomarcadores resultan más útiles, no individualmente, sino como parte de un panel compuesto de diferentes biomarcadores interrelacionados. Un panel o conjunto de biomarcadores concretos mantienen una relación más directa y unívoca con procesos biológicos determinados, y por tanto también con la enfermedad que los origina. Un ejemplo de esto es el cáncer de mama, en el que un conjunto de biomarcadores indica, por un lado la existencia de la enfermedad, y por el otro la naturaleza de la misma. Tal y como se explicó en la Sección 2.1.2.3, esta información resulta de un interés máximo, no solo para mejorar la fiabilidad del diagnóstico sino también con fines de pronóstico y para diseñar una estrategia óptima de tratamiento.

Dado el importantísimo impacto del cáncer de mama en nuestra sociedad (ver Sección 2.1.2.3), se ha optado por diseñar biosensores para la determinación de biomarcadores relacionados con el cáncer de mama. Esta aplicación supone el reto de desarrollar bioplataformas capaces de determinar varios marcadores simultáneamente ( $\text{ER}\alpha$ , PR y ErbB2) y en muestras de mayor complejidad que el suero humano.

Antes de abordar el diseño de los biosensores electroquímicos para estos biomarcadores se decidió realizar una caracterización exhaustiva de la cinética de la reacción empleada en el inmunoreconocimiento de uno de estos marcadores (ErbB2) por SPR. La información obtenida puede resultar de gran utilidad puesto que las características del biosensor que se desarrolle están estrechamente relacionada con la afinidad de los inmunoreactivos empleados en su fabricación. Este estudio previo resultará también muy útil para comparar los resultados obtenidos empleando transducción óptica y electroquímica.



### 4.2.1. Estrategia SPR

Se va a emplear SPR (ver Sección 3.1.2.1) como técnica de detección alternativa a la herramienta principal desarrollada en este trabajo (inmunoensayo sobre partículas magnéticas y posterior detección electroquímica). De los diferentes biomarcadores relacionados con el cáncer de mama que se pretenden estudiar (ER $\alpha$ , PR y ErbB2), se ha optado por este último por su interés como herramienta de diagnóstico y tratamiento en el cáncer de mama (ver Sección 2.1.2.3).

#### 4.2.1.1. Inmunosensor SPR para detección de ErbB2

En el desarrollo del inmunosensor SPR para detección de ErbB2 se han empleado dos estrategias diferentes: un inmunoensayo tipo sándwich sin marca y otro basado en el marcaje con AuNPs con objeto de amplificar la respuesta.

En ambos casos las disoluciones estándar de ErbB2 empleadas se han preparado en *running buffer* (PBST + 1 % BSA) (ver 3.1.2.1). En el caso de las muestras de suero, estas se han diluido al 50 % en una solución especial diseñada para minimizar uniones no específicas consistente en *running buffer* suplementado con 4 M de NaCl y Tween al 0,1 % (peso/volumen). Para funcionalizar cada uno de las dos zonas de sensado del chip (canal principal y canal de referencia) se han realizado inyecciones de 200  $\mu$ L de solución, empleando un tiempo de contacto total de 8 min. El canal principal se ha funcionalizado con antiErbB2 y el canal de referencia con MIgG (para obtener una superficie con una monocapa de anticuerpos similar a la principal, pero no específica).

Para los casos en los que una detección directa *label-free* no es suficiente, se ha realizado una amplificación por medio de inyecciones consecutivas de 75  $\mu$ L de antiErbB2 y SAV-AuNPs (40 nm) diluidas en una proporción 1:20.

La regeneración de la superficie del chip, proceso por el cual se recupera íntegramente la monocapa de anticuerpos de la funcionalización, se ha llevado a cabo mediante la inyección de 25  $\mu$ L de una solución de HCl 100 mM. Este proceso elimina todo el antígeno inmovilizado en la superficie, manteniendo intactos los anticuerpos inmovilizados sobre el oro. La estabilidad de este proceso se ha verificado, confirmando la actividad de los anticuerpos de captura tras al menos 300 ciclos de regeneración.

En todos los casos, se realizaron al menos dos réplicas por muestra. Para evitar un eventual *efecto memoria*, se han ensayado todas las muestras en un orden aleatorio. Al mismo tiempo, con el objetivo de poder realizar una doble referencia (Myszka, 1999), se han inyectado blancos o muestras con un contenido nulo de ErbB2. El análisis de los datos registrados se ha llevado a cabo

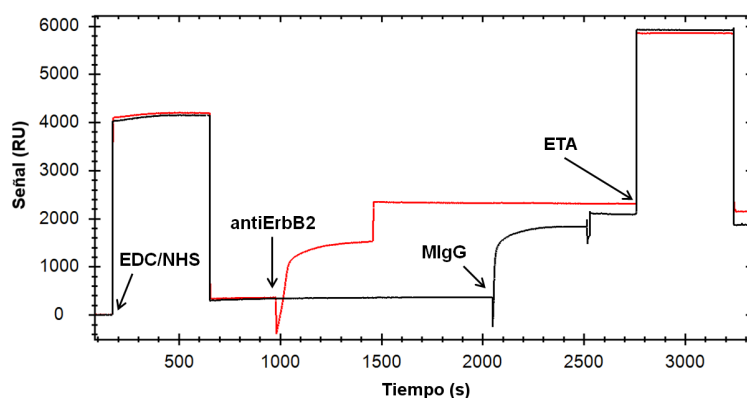
a través del programa Tracedrawer (v1.3, Ridgeview Instruments AB, Uppsala, Suecia)

#### 4.2.1.2. Biofuncionalización superficial del sensor

Al contrario que para el análisis de las cinéticas de las uniones biomoleculares, en el caso de emplear SPR para determinaciones, lo más deseable es obtener una superficie de bioreconocimiento lo más compacta posible. A mayor número de anticuerpos de inmovilizados sobre la superficie, mayor será la eficiencia de la captura del analito en solución, aumentando de esta manera la sensibilidad de la detección. Un recurso habitual en sistemas de SPR es el empleo de chips modificados con un hidrogel de dextran carboximetilado, porque la estructura tridimensional que se crea aumenta la capacidad de captura específica. Sin embargo, en ocasiones, estos chips no ofrecen tan buenos resultados al trabajar con suero u otro tipo de matrices complejas (Masson et al., 2006), ya que favorecen las uniones de otros componentes no específicos presentes en la muestra. Puesto que se pretende trabajar con muestras complejas, con el fin de evitar adsorciones inespecíficas en este trabajo se han empleado chips de oro modificados con SAMs de MUA sobre las que se inmoviliza covalentemente el anticuerpo de captura empleando la química EDC/NHS, tal y como se ha detallado en la Sección 3.3.6.

Siguiendo el protocolo descrito en la Sección 3.3.7.1, se ha realizado un estudio previo para la elección de la solución tampón ideal con el fin de maximizar el rendimiento de la funcionalización. Seleccionando adecuadamente el pH de la solución en la que se diluyen los anticuerpos primarios, se puede provocar una atracción electrostática de estos anticuerpos hacia la superficie de oro del chip que se desea funcionalizar, aumentando así el rendimiento del procedimiento. Para seleccionar la solución tampón óptima, se han empleado varias soluciones de NaOAc en un rango de pH 4,5–6 para ambos anticuerpos (ErbB2 y MlgG). El valor de pH óptimo se ha seleccionado comparando el valor de la pendiente del sensograma para inyecciones de 15  $\mu\text{L}$  de muestra. Los resultados obtenidos demuestran que el pH óptimo para la inmovilización de ambos anticuerpos es de 5,5. En ambos casos, para garantizar el máximo recubrimiento de la superficie del chip sensor, se han empleado altas concentraciones de anticuerpo (20  $\mu\text{g/mL}$ ), asegurando de esta manera la saturación en las dos zonas de sensado, con una señal de aproximadamente 2200 Unidades de Respuesta (RU) (ver Figura 4.24), valor típico en este tipo de chips.

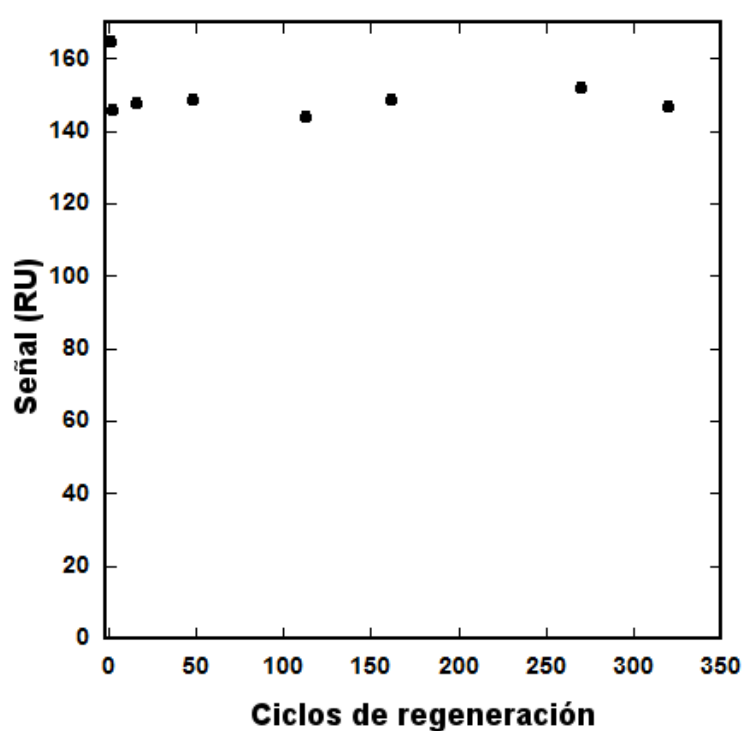
Es importante recordar que durante todo el proceso de funcionalización del chip se ha empleado PBST como *running buffer*, que se ha suplementado con BSA al 1 % para el resto de los ensayos. Esta proteína, empleada durante la funcionalización, se uniría a la superficie del chip a través de sus aminas primarias, al igual que los anticuerpos que se desea inmovilizar sobre las diferentes



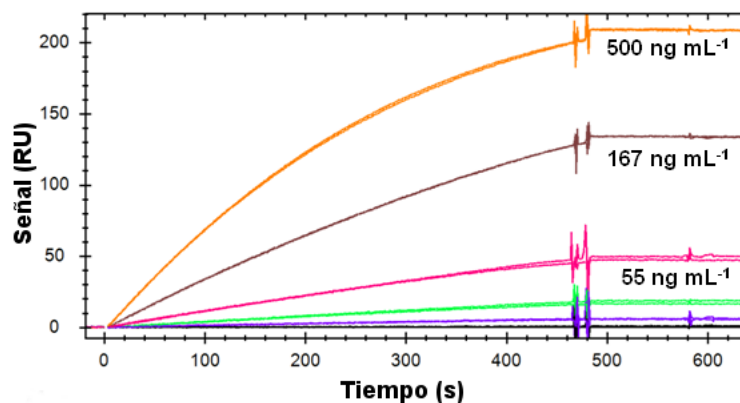
**Figura 4.24:** Sensograma de la funcionalización del chip para la detección de ErbB2. El chip de oro con la monocapa autoensamblada de MUA se funcionaliza a través de la química EDC/NHS: En primer lugar una inyección de 200  $\mu\text{L}$  de una mezcla 1:1 de EDC 200 mM y NHS 50 mM sobre ambas zonas de sensado. A continuación, una inyección de 200  $\mu\text{L}$  de antiErbB2 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en NaOAc pH5,5 en la zona de sensado activa (canal principal, línea roja) seguida de otra de MlgG 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en NaOAc pH 6,0 en la zona de referencia (canal de referencia, línea negra) para inmovilizar covalentemente los diferentes anticuerpos covalentemente a la superficie del chip. Finalmente, los grupos NHS-éster sin reaccionar se bloquean por medio de una inyección de 200  $\mu\text{L}$  de ETA-HCl (pH 8,5). La superficie satura cerca de los 2200 RU.

zonas de sensado y compitiendo con estas por este espacio. Esto resultaría en un descenso drástico de la carga de anticuerpos específicos sobre la superficie con la consiguiente pérdida de sensibilidad que ello conlleva. Por tanto resulta imprescindible evitar el uso de BSA u otras proteínas portadoras durante la fase de funcionalización.

Un vez finalizado el proceso de funcionalización, se cambia a *running buffer* suplementado con 1 % de BSA y se espera hasta obtener una señal de base estable ( $\sim 2$  min). Antes de realizar el inmunoensayo completo, se comprobó la actividad de la superficie funcionalizada realizando repetidas inyecciones de 25  $\mu\text{L}$  de ErbB2 200 ng/mL preparadas en PBST con 1 % de BSA y regenerando la superficie (ver Sección 3.3.10) tras cada una de ellas. Para seleccionar la solución de regeneración óptima, capaz de disociar todas las uniones antígeno-anticuerpo sin afectar a la afinidad de los anticuerpos inmovilizados, se han ensayado varias alternativas, como glicina (en rangos de pH de 1,5–3,0 y de concentración de 10–100 mM) y HCl (en un rango de concentraciones de 10 a 100 mM). Los mejores resultados se han obtenido empleando HCl 100 mM, que proporciona una regeneración total de la superficie sin afectar a la afinidad de los anticuerpos inmovilizados durante más de 400 ciclos de unión y posterior regeneración, tal y como se ha explicado anteriormente (ver Figura 4.25).



**Figura 4.25:** Ensayos de actividad de los anticuerpos de captura (antiErbB2) inmovilizados sobre la superficie del chip de SPR, realizando ciclos secuenciales de reconocimiento de ErbB2 200 ng/mL. Tras una disminución de un 10 % de la señal tras la primera regeneración, la respuesta del sensor se mantiene estable.

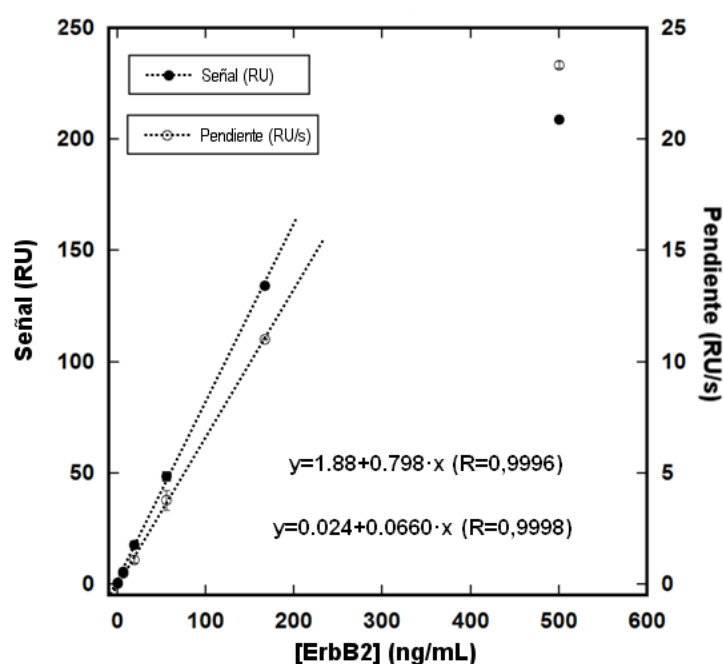


**Figura 4.26:** Sensogramas obtenidos tras la inyección de  $200\mu\text{L}$  de estándares de diferente concentración de ErbB2 (6,25–500 ng/mL preparados en PBST suplementado con 1 % de BSA). Tras cada inyección la superficie del chip ha sido regenerada por medio de una inyección de  $25\mu\text{L}$  de HCl 100mM. El sensograma está doblemente referenciado.

#### 4.2.1.3. Optimización de variables experimentales

Puesto que una de las principales ventajas de la técnica SPR es la de monitorizar reacciones de afinidad sin necesidad de emplear marcas, esta es la primera configuración que se ha ensayado para la determinación de ErbB2. Con este objetivo, se ha realizado una simple inyección de  $200\mu\text{L}$  (8 min) de estándares con diferente concentración de ErbB2 (rango de concentración comprendido entre 6,2 y 500 ng/mL preparadas en PBST 1 % BSA), incluyendo blancos (muestra con contenido nulo de ErbB2). En la Figura 4.26 puede apreciarse que mayores tiempos de contacto conducirían a mayores señales, ya que estas están aún lejos de saturarse. El proceso de unión del analito está fuertemente condicionado por el transporte de masa, especialmente a bajas concentraciones. Esto indica la alta capacidad de la superficie funcionalizada para capturar el analito, así como la idoneidad de la técnica para la detección de ErbB2.

Partiendo de estos mismos datos pero empleando el valor medido al final de la inyección y el valor de la pendiente inicial (15 s), se ha construido una curva de calibración (Figura 4.27). Como puede apreciarse, excluyendo el valor de concentración más elevado (500 ng/mL de ErbB2), el resto de puntos pueden ajustar de manera muy precisa a una recta. Empleando este ajuste lineal y aplicando la metodología expuesta en la Sección 3.4.2.1, se han obtenido un LD de 3,8 ng/mL y un LQ de 12,7 ng/mL. Como se ha comentado anteriormente, en la 4.26 se observa como una mayor cantidad de muestra resultaría en un LD más reducido; sin embargo, teniendo en cuenta consideraciones de carácter



**Figura 4.27:** Curva de calibración para ErbB2, obtenido por medio de inyecciones de 200  $\mu$ L de muestras con 6,25–500 ng/mL de ErbB2, preparadas en PBST con 1 % de BSA. Tras cada inyección la superficie del chip ha sido regenerada por medio de una inyección de 25  $\mu$ L de HCl 100mM.

práctico (coste del ensayo y disponibilidad de la muestra) se ha establecido en 200  $\mu$ L el volumen máximo de muestra a emplear.

Puesto que el valor de LD obtenido es inferior al umbral establecido para el ErbB2 en suero humano de 15 ng/mL en el diagnóstico del cáncer de mama (Carney et al., 2013), se ha procedido a la aplicación del sensor de SPR para el análisis de este tipo de muestra. El análisis de suero, tanto diluido como sin diluir, en inmunosensores *libres de marca* es un asunto delicado y dificultoso, por la complejidad de la muestra y las **uniones no específicas** que pueden ocurrir. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los inmunosensores que emplean un marcado del analito por medio de un segundo reactivo específico que minimiza las interferencias que provengan de las uniones inespecíficas de otros componentes presentes en grandes cantidades en la muestra, en este sensor de SPR *libre de marca* la detección es directa y en un solo paso, por lo que es necesario abordar este problema desde otro punto de vista.

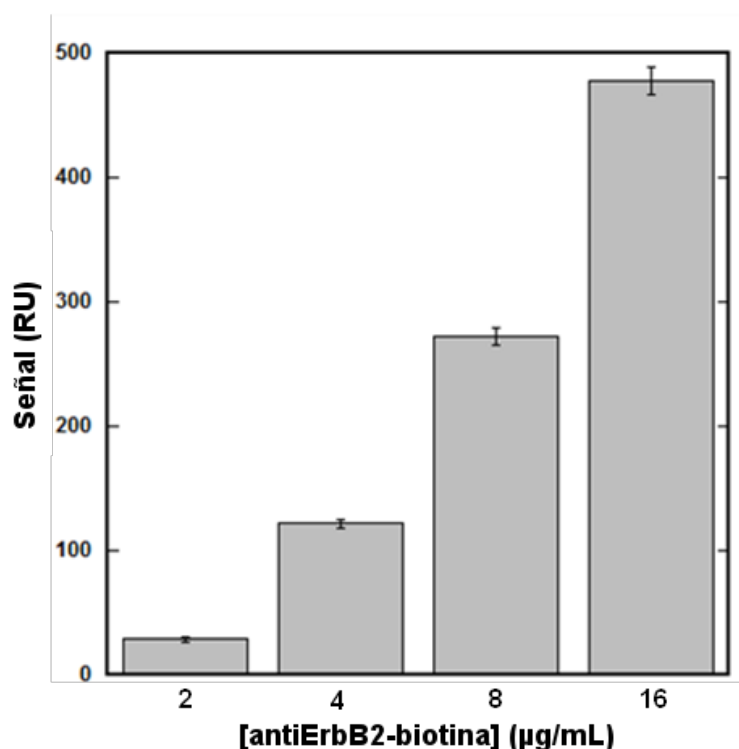
En la literatura, la estrategia más habitual es el empleo de una solución que minimice este proceso de adsorción inespecífica indeseado y que se ha empleado con éxito en varios sensores de SPR (Treviño et al., 2009; Martínez-Perdigüero et al., 2014a; Uludag y Tothill, 2012; Ayela et al., 2007; Situ et al.,

2008). Las uniones no específicas, producidas por diferentes fuerzas moleculares (interacciones de carga, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, etc.) pueden verse afectadas por varios factores, cuya importancia relativa depende de las propiedades del analito (punto isoelectrico, carga, tamaño, composición, etc.) El pH del medio tiene una importancia enorme, ya que determina si una biomolécula tiene una carga neta positiva o negativa. Si la superficie del sensor y una biomolécula tienen cargas contrarias, es de esperar que se produzca una atracción de naturaleza no específica entre ambas. Por tanto, el pH del medio debería ser cercano al punto isoelectrico de la proteína. El uso de proteínas bloqueantes puede resultar también de gran ayuda para reducir uniones no específicas. El BSA, por ejemplo, es una proteína globular con subgrupos hidrofílicos e hidrofóbicos que rodean otras proteínas, evitando así que estas se unan a otras proteínas, superficies cargadas, etc. Surfactantes como el Tween, a bajas concentraciones, permiten interrumpir interacciones hidrofóbicas que dan lugar a uniones no específicas. Por último, el aumento de la concentración de NaCl dificulta que las cargas de la proteína interactúen con las cargas de la superficie del chip, lo cual se traduce en una disminución de las uniones no específicas relacionadas con interacciones por carga.

Es importante tener en cuenta que todas estas estrategias, determinantes a la hora de minimizar uniones no específicas, pueden cambiar las condiciones del medio y que en un caso extremo podrían provocar la inhibición del reconocimiento o incluso desnaturalización de las biomoléculas. En el caso concreto del inmunosensor de ErbB2, se ha evaluado la influencia de diferentes concentraciones de Tween, NaCl y BSA (de Mol y Fischer, 2010). Las mejoras más notables se han obtenido a través de la reducción de las interacciones electrostáticas entre las proteínas del suero y la superficie del sensor por medio de la adición de NaCl. La solución óptima final, compuesta por 4 M NaCl y 0,1 % de Tween, ha conducido a una reducción de un 85 % de las uniones no específicas. Sin embargo, en estas condiciones, la detección de ErbB2 solo ha sido posible para elevadas concentraciones de proteína (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ErbB2), quedando limitada su utilidad práctica en el análisis de muestras reales.

Teniendo esto en cuenta, se ha optado por aumentar la sensibilidad del sensor por medio de una **amplificación** de la señal basada en el empleo de AuNPs. Para ello, sobre el ErbB2 capturado, se une un anticuerpo secundario biotinilado (biotina-antiErbB2) y sobre este las SAv-AuNPs. Con este formato tipo *sándwich* se pierden las características *sin marca* de la detección, sin embargo es de esperar que esta nueva configuración otorgue mayor selectividad (basada en dos pasos de afinidad con anticuerpos específicos) y sensibilidad (gracias al aumento de señal producido por los anticuerpos secundarios y las AuNPs) al sensor.

Con el objetivo de maximizar la respuesta, se han optimizado también las etapas adicionales que conlleva este formato *sándwich* con amplificación. En

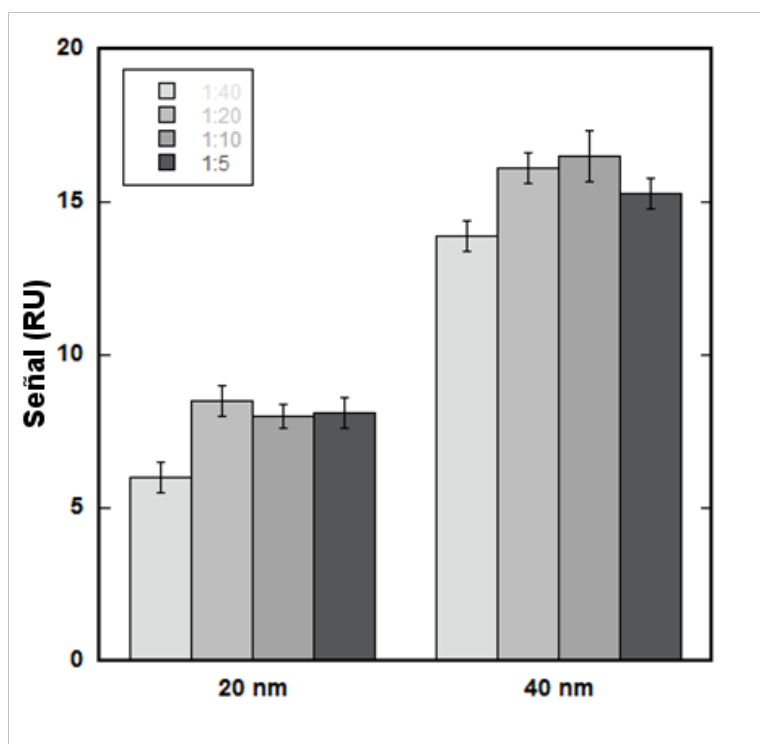


**Figura 4.28:** Respuesta del sistema de detección SPR en función de la amplificación con diferentes concentraciones de biotina-antiErbB2. La concentración de ErbB2 en la muestra ha sido de 4 ng/mL en todos los casos. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).

primer lugar, se ha seleccionado la concentración óptima de **anticuerpo secundario biotina-antiErbB2**, dentro de un rango de 2 µg/mL a 16 µg/mL, comparando el valor de la señal de SPR al analizar una muestra con un contenido conocido de analito (4 ng/mL de ErbB2) (ver Figura 4.28). Aunque las señales más altas se obtienen con las mayores concentraciones de anticuerpo, en proporción, el mayor aumento de señal se obtiene entre los 2 µg/mL y los 4 µg/mL. A partir de este valor, el aumento de la señal se da a un ritmo menor, con una tendencia lineal. Teniendo en cuenta además que este componente es el más costoso de todos los que se emplean en el formato *sandwich* completo y buscando un compromiso entre sensibilidad y coste por ensayo, se ha seleccionado el valor de 4 µg/mL de antiErbB2 como óptimo y, por tanto, ha sido el valor empleado para el resto de los ensayos (realizando inyecciones de 75 µL a menos que se especifique lo contrario).

De forma complementaria se han optimizado también las características principales de las **SAv-AuNPs**, tanto en tamaño como en concentración. Se han ensayado dos tamaños diferentes de AuNPs, de 20 nm y de 40 nm. Para ambas se han ensayado concentraciones diferentes, realizando diluciones se-

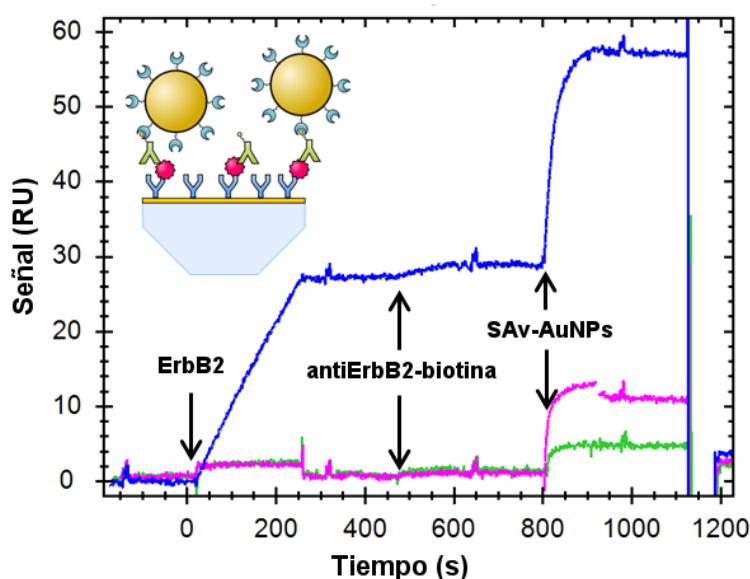




**Figura 4.29:** Señales SPR obtenidas en la amplificación de la detección ErbB2 por medio de biotina-antiErbB2 y SAV-AuNPs de diferentes tamaños y concentraciones. Las concentraciones de ErbB2 y biotina-antiErbB2 han sido de 10 ng/mL y 4  $\mu$ g/mL respectivamente. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

riadas 1/2 en un rango de concentraciones de 1:5 a 1:40 (en relación al stock original, a una concentración de OD10). Como puede observarse en la Figura 4.29, para ambos tipos de partículas la señal se satura cuando se emplean diluciones menores de 1:20 y la sensibilidad obtenida con las partículas de 40 nm es el doble que la obtenida con las de 20 nm, resultado esperable teniendo en cuenta que el efecto de masa es mayor en las partículas de 40 nm. En base a estos resultados, se ha seleccionado trabajar con partículas de 40 nm diluidas 20 veces.

En la Figura 4.30 se muestra el **sensograma** para el inmunoensayo con doble amplificación desarrollado (una primera amplificación por medio de anticuerpos secundarios y una amplificación posterior por medio de AuNPs) para tres muestras con concentraciones diferentes de estándar de ErbB2 preparadas en PBST +1 % BSA. Como puede observarse, para el mayor valor de concentración ensayado (6,11 ng/mL de ErbB2), la señal de SPR tras la inyección de la muestra es medible y, por tanto, la amplificación no es estrictamente necesaria para la detección. Sin embargo, cuando la concentración de analito es menor (0,68 ng/mL de ErbB2), la señal que produce la captura del mismo no es discer-

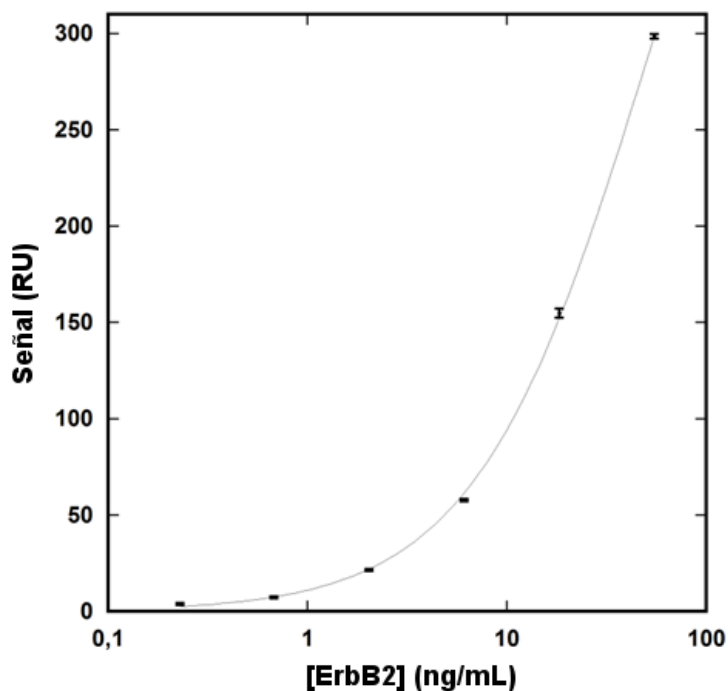


**Figura 4.30:** Sensograma obtenido por medio del inmunosensor con doble amplificación (biotina-antiErbB2 + SAV-AuNPs) para tres disoluciones estándar con diferente contenido de ErbB2 (0, 0,68 ng/mL y 6,11 ng/mL) preparadas en PBST +1 % BSA. El detalle muestra un esquema del inmunocompleo formado sobre la superficie del chip de SPR.

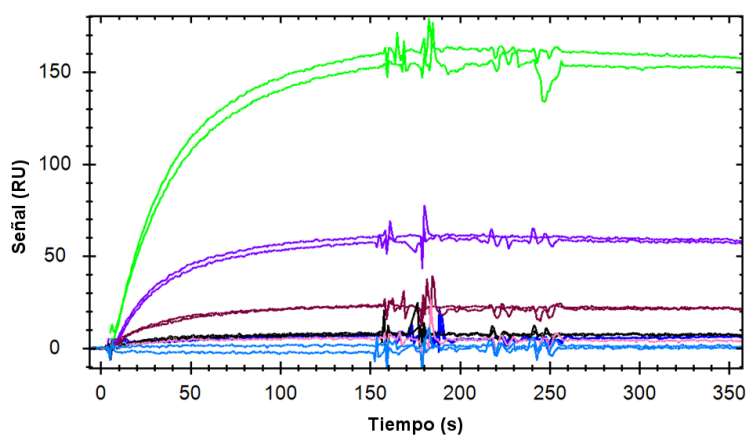
nible de la señal de base, lo que hace imprescindible el empleo de la estrategia de amplificación descrita para su determinación. Es destacable también la baja señal obtenida al analizar una muestra con contenido nulo de ErbB2, lo que confirma la ausencia de adsorciones inespecíficas significativas del anticuerpo secundario y de las AuNPs en ausencia de proteína diana.

Empleando el inmunoensayo en *sándwich* con amplificación mediante el empleo de AuNPs se ha construido una **curva de calibración**, en un rango de concentraciones comprendido entre 0,23 ng/mL y 55 ng/mL de ErbB2 (Figura 4.31). Conviene aclarar en este punto que la señal amplificada es proporcional a la cantidad de ErbB2 capturado sobre la superficie del sensor, y por tanto la información contenida en esta señal amplificada puede emplearse directamente para construir la curva de calibración o caracterizar el proceso de unión del analito.

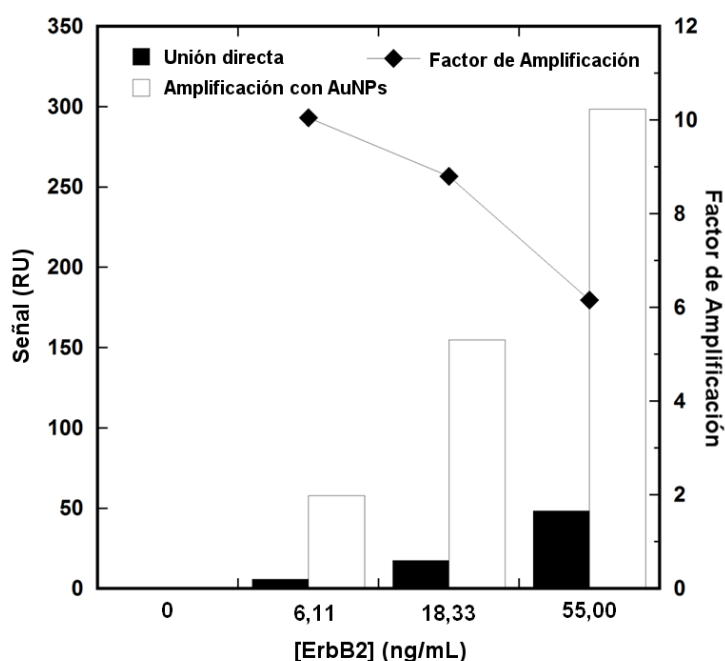
La Figura 4.32 muestra la parte del sensograma correspondiente a la amplificación por medio de las AuNPs. A partir de estas curvas se ha estimado un LD de 180 pg/mL, valor 20 veces menor al obtenido mediante el proceso de detección *libre de marca* (sin AuNPs), lo que confirma la mejora de rendimiento que supone este proceso de amplificación. Aplicando un modelo de interacción molecular 1:1 se ha calculado una  $K_D$  de  $260 \pm 20$  pM, lo que demuestra la elevada afinidad de los anticuerpos empleados para la determinación.



**Figura 4.31:** Curva de calibración obtenida para la determinación de estándares de ErbB2 en un rango de 0,23 ng/mL a 55 ng/mL por medio de SPR empleando un inmunoensayo tipo *sándwich* y amplificación por medio de AuNPs. La curva se ha ajustado a un modelo de interacción molecular 1:1. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



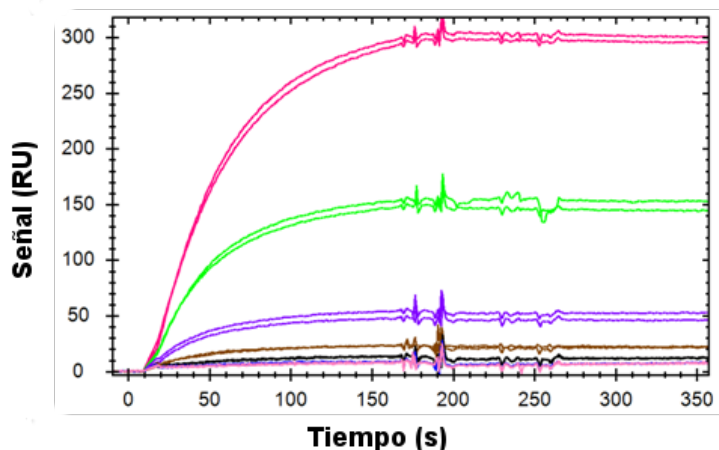
**Figura 4.32:** Sensograma doblemente referenciado obtenido durante el proceso de amplificación por medio de AuNPs para la detección de ErbB2. El rango de concentraciones ensayado ha sido de 0,23 ng/mL a 55 ng/mL (diluciones seriadas 1/3), incluyendo muestras con contenido nulo de analito.



**Figura 4.33:** Comparación de los dos formatos de inmunoensayo empleados, la captura y detección directa de ErbB2 sin amplificación y el formato *sándwich* para la amplificación por medio de AuNPs. Para ambas aproximaciones se muestran las señales obtenidas para diferentes concentraciones de ErbB2, así como el factor de actividad logrado.

Pese a la notable mejora obtenida en términos de sensibilidad a través de la amplificación, conviene realizar una comparación más directa entre ambos inmunoensayos (*sin marca vs sándwich* con AuNPs). En la Figura 4.33 se muestran en paralelo los rendimientos de ambos formatos, en aquellas concentraciones de ErbB2 en las que se han obtenido señales medibles, junto con el factor de amplificación calculado para cada una de ellas. Como puede observarse, el factor de amplificación decae para las concentraciones de analito más elevadas, aunque el proceso de amplificación siempre se traduce en un aumento de la señal. Conviene destacar también que para las muestras con un contenido nulo de ErbB2 no se observó ningún cambio de señal, ni siquiera para el inmunoensayo con amplificación, lo cual demuestra la alta especificidad de los reactivos empleados.

En comparación con el único biosensor de ErbB2 basado en una detección por SPR localizado en la literatura (Martin et al., 2006), el LD obtenido en este trabajo es 3 y 60 veces menor empleando el inmunoensayo directo y amplificado respectivamente (3,8 ng/mL y 190 pg/mL *vs* 11 ng/mL). Este aumento de la sensibilidad es particularmente relevante a la hora de trabajar con muestras escasas, debido a la posibilidad de trabajar con volúmenes más pequeños.

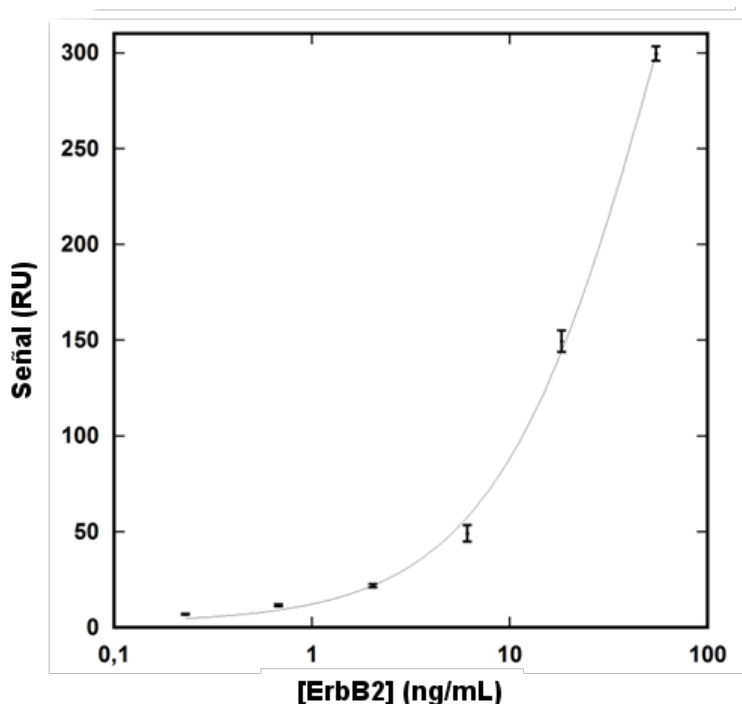


**Figura 4.34:** Sensograma de SPR doblemente referenciado obtenido tras el paso de amplificación con AuNPs para la determinación de ErbB2 en muestras de suero diluidas al 50 % y suplementadas con concentraciones conocidas de un estándar de ErbB2 por medio del inmunoensayo en formato *sándwich*. Las muestras contienen concentraciones de ErbB2 en el rango de 0,23 ng/mL a 55 ng/mL (diluciones seriadas en una proporción 1/3), incluyendo una con contenido nulo de analito. Se han realizado dos repeticiones por cada una de ellas.

#### 4.2.1.4. Análisis de muestras de suero

Se ha aplicado el inmunosensor de SPR desarrollado, en su versión *sándwich* con amplificación por medio de AuNPs a la determinación de ErbB2 en muestras de suero enriquecidas con concentraciones conocidas de un estándar de ErbB2 y suplementadas con la solución optimizada para minimizar las uniones no específicas. Para ello se han diluido las muestras originales de suero al 50 % en esta disolución bloqueante y se han introducido en el sistema de SPR en inyecciones de 200  $\mu$ L. El sensograma obtenido para la etapa de amplificación final con SAV-AuNPs se muestra en la Figura 4.34, con el análisis de concentraciones variables de ErbB2 en el rango de 0,23 ng/mL a 55 ng/mL (diluciones seriadas en una proporción 1/3), con dos repeticiones por cada una de ellas. Como puede comprobarse, las muestras sin suplementar (0 ng/mL de ErbB2 añadido) producen señales de SPR inapreciables, lo cual es indicativo de la alta selectividad del inmunoensayo desarrollado.

Empleando los datos del sensograma anterior (Figura 4.34), se ha construido una curva de calibración, mostrada en la Figura 4.35. A partir de esta curva de calibración se ha calculado un LD de 180 pg/mL empleando la metodología expuesta en la Sección 3.4.2.1, valor muy similar al obtenido para estándares de ErbB2 (preparados en PBST), lo que confirma la elevada efectividad de la estrategia implementada para eliminar todas las uniones no específicas que

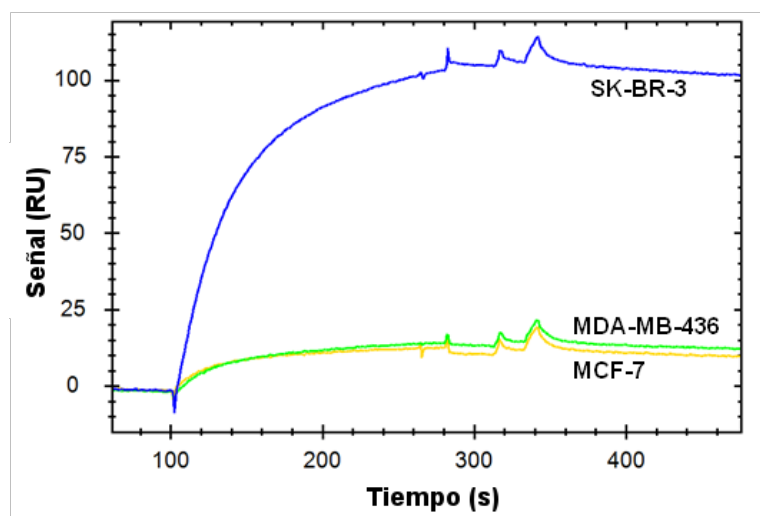


**Figura 4.35:** Curva de calibración de ErbB2 por medio del inmunoensayo en formato *sándwich* y detección por SPR. Las muestras contienen concentraciones de ErbB2 en el rango de 0,23 ng/mL a 55 ng/mL (diluciones seriadas en una proporción 1/3), incluyendo una con contenido nulo de analito. Se han realizado dos repeticiones por cada una de ellas.

pueden producirse en un medio tan complejo como el suero humano. El ajuste de la curva obtenida a un modelo de interacción 1:1, ha permitido el cálculo de una  $K_D$  de  $304 \pm 70$  pM, valor muy cercano al calculado anteriormente en PBST. En cualquier caso, es necesario puntualizar en este punto que puesto que las muestras de suero se han diluido previamente al 50 %, el LD efectivo resulta de 360 pg/mL, valor 42 veces inferior al valor de corte comúnmente aceptado (15 ng/mL).

#### 4.2.1.5. Análisis de lisados celulares

Los resultados obtenidos en el análisis de muestras de suero, en términos de sensibilidad, especificidad y eliminación del efecto matriz, han motivado la realización de la cuantificación de ErbB2 en muestras de lisados celulares. Para ello, se analizaron varios lisados celulares, provenientes de diferentes líneas celulares de cáncer de mama metastásico con distintos niveles de expresión de ErbB2: MDA-MB-436, SK-BR-3 y MCF-7. Mientras que las células MDA-MB-436 y MCF-7 contienen un número de copias normal del gen *ErbB2*, las células



**Figura 4.36:** Sensograma obtenido tras el análisis del contenido de ErbB2 en diferentes lisados ( $40\ \mu\text{g}$ ) provenientes de varias líneas celulares mediante un inmunoensayo tipo *sándwich*. Por simplificación, solo se muestra la etapa final del ensayo, correspondiente a la amplificación por medio de AuNPs.

SK-BR-3 presentan un número de copias aproximadamente 10 veces mayor de este gen, lo que se traduce en una mayor expresión del receptor ErbB2 (Xiao et al., 2009).

Para realizar estas medidas, se emplearon  $40\ \mu\text{g}$  de lisado de cada una de las diferentes líneas, y se diluyeron en un tampón de lisis hasta obtener un volumen total de  $200\ \mu\text{L}$ . Sobre el chip funcionalizado de SPR se han inyectado triplicados de cada una de las diferentes muestras. Para la detección final se ha optado por el inmunoensayo en formato *sándwich* y amplificación por medio de AuNPs, por ser la configuración que mejores sensibilidades y especificidades ha ofrecido. La Figura 4.36 muestra los resultados obtenidos.

Como puede observarse, el contenido endógeno de ErbB2 en los lisados de la línea celular SK-BR-3 es muy superior al de las células MCF-7 y MDA-MB-436. Estos resultados también confirman la ausencia de adsorciones inespecíficas y de efecto matriz en estas muestras de lisados celulares.

Para poder cuantificar los diferentes niveles de expresión de cada tipo de lisado celular, se ha preparado una curva de calibración con disoluciones estándares de distinta concentración de ErbB2 preparadas en el mismo tampón de lisis empleado para preparar y diluir los lisados celulares. El contenido de ErbB2 en cada uno de los lisados celulares se ha obtenido por interpolación de las señales obtenidas para cada uno de los lisados celulares en dicho calibrado. Para la línea celular ErbB2+ SK-BR-3 se ha estimado un contenido neto de  $230 \pm 10\ \text{ng}/\mu\text{g}$  (ng de ErbB2 por  $\mu\text{g}$  de lisado). Para las líneas ErbB2- MDA-MB-436 y MCF-7 se ha calculado una concentración de ErbB2 de  $30 \pm 10\ \text{ng}/\mu\text{g}$ . Es-

tos valores obtenidos, que están de acuerdo con la hiperexpresión de ErbB2 en las células SK-BR-3, servirán de referencia para demostrar la validez de un magnetoinmunosensor amperométrico desarrollado para determinar también el contenido de este receptor proteico en este tipo de muestras.

#### 4.2.2. Magnetoinmunosensores amperométricos

Los biosensores electroquímicos destacan por sus ventajas analíticas y sus posibilidades de integración en un dispositivo portátil, su bajo coste, simplicidad y capacidad de multiplexado. Esta última característica resulta especialmente interesante en un escenario como el del cáncer de mama, en el que el diagnóstico se basa en el análisis de un conjunto de biomarcadores, tal y como se explicó en la Sección 2.1.2.3. Al mismo tiempo, teniendo en cuenta la alta incidencia de la enfermedad y que el diagnóstico precoz juega un papel determinante en el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes, estas características prácticas cobran una gran importancia, situando a la detección electroquímica en una posición privilegiada. Es por eso que a pesar de los buenos resultados obtenidos mediante el sensor de SPR, el objetivo perseguido en este trabajo haya sido el desarrollo de un sensor electroquímico, que se describe a continuación.

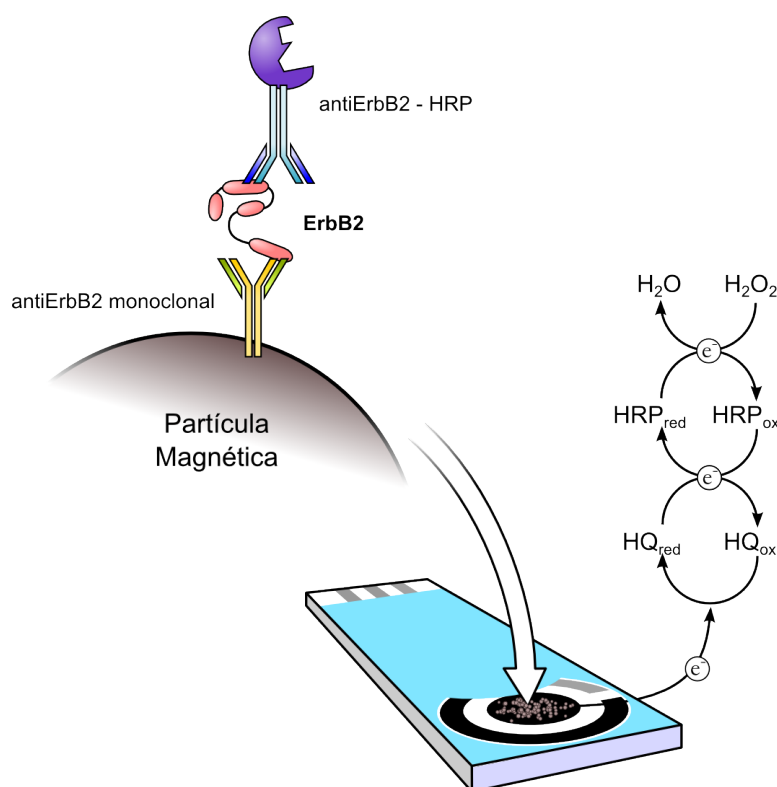
##### 4.2.2.1. Determinación individual de biomarcadores

Aunque el objetivo final sea la detección simultánea de los tres biomarcadores de interés (ErbB2, ER $\alpha$  y PR), es conveniente desarrollarlos y caracterizarlos individualmente, para su integración posterior en una misma plataforma de multidetección. A continuación se presentan los resultados obtenidos en los desarrollos individuales de cada uno de estos biosensores.

##### ErbB2

La configuración del inmunosensor empleado para la cuantificación de ErbB2 es la mostrada en la Figura 4.37. El sensor está basado en un formato tipo *sándwich*, que requiere en primer lugar la funcionalización de las MBs con un anticuerpo de captura específico. Para ello, se inmoviliza covalentemente a la superficie de las HOOC-MBs un anticuerpo monoclonal antiErbB2 empleando la química EDC/NHS (protocolo desarrollado previamente en la Sección 3.3.2) y a continuación se bloquea la superficie mediante ETA-HCl, con el fin de desactivar todos los grupos activos sobre los que no se ha inmovilizado anticuerpo de captura para que no sean susceptibles de inmovilizar otros reactivos con grupos amino susceptibles de inmovilización. Estas partículas funcionalizadas se emplean para capturar específicamente la proteína diana presente en





**Figura 4.37:** Representación esquemática del inmunocomplejo formado para la detección de ErbB2. Sobre la HOOC-MBs funcionalizada con antiErbB2 se captura el analito (ErbB2) y este se marca enzimáticamente con antiErbB2-HRP para su cuantificación. Las MBs con el inmunocomplejo totalmente formado se llevan sobre el WE para la detección electroquímica final, en la que participan el  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato y la HQ como mediador.

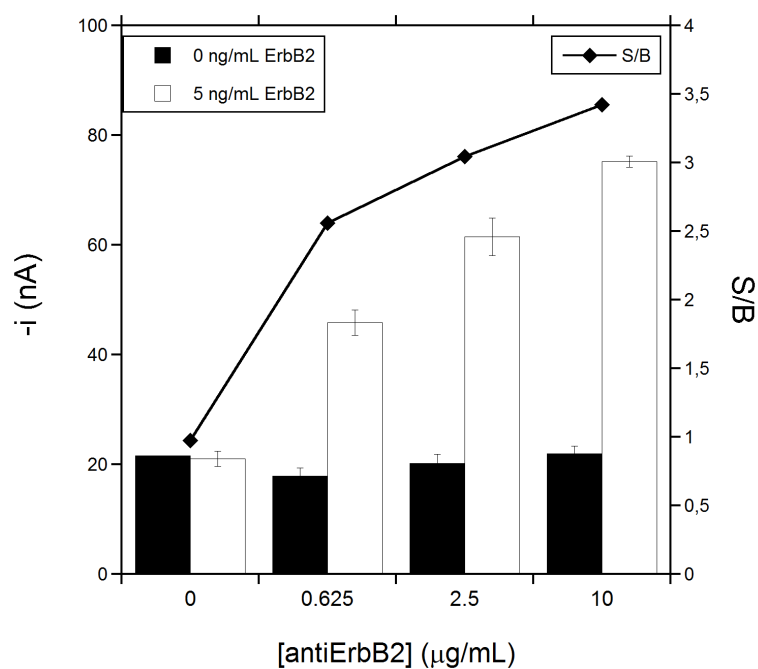
la muestra, que se marca enzimáticamente por medio de un anticuerpo monoclonal secundario con HRP (antiErbB2-HRP). Seguidamente, las MBs con el inmunocomplejo formado sobre su superficie se capturan magnéticamente sobre el WE del SPCE (situando para ello el SPCE sobre una base con un pequeño imán de neodimio incrustado) y se traslada a la celda electroquímica en donde se realiza la determinación final, monitorizando la corriente catódica debida a la reducción enzimática del  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediada por la HQ.

Con el objetivo de maximizar la sensibilidad y especificidad de la medida al mismo tiempo que se respetan otras características como el tiempo de ensayo o el coste, es necesario evaluar la influencia que tienen las variables experimentales que afectan significativamente a la respuesta amperométrica y seleccionar los valores óptimos. Es importante destacar que estas optimizaciones deben realizarse de manera independiente, ya que la reacción antígeno-anticuerpo es específica de cada caso y los valores de las diferentes variables experimentales no siempre son extrapolables. Además, dependiendo del ran-

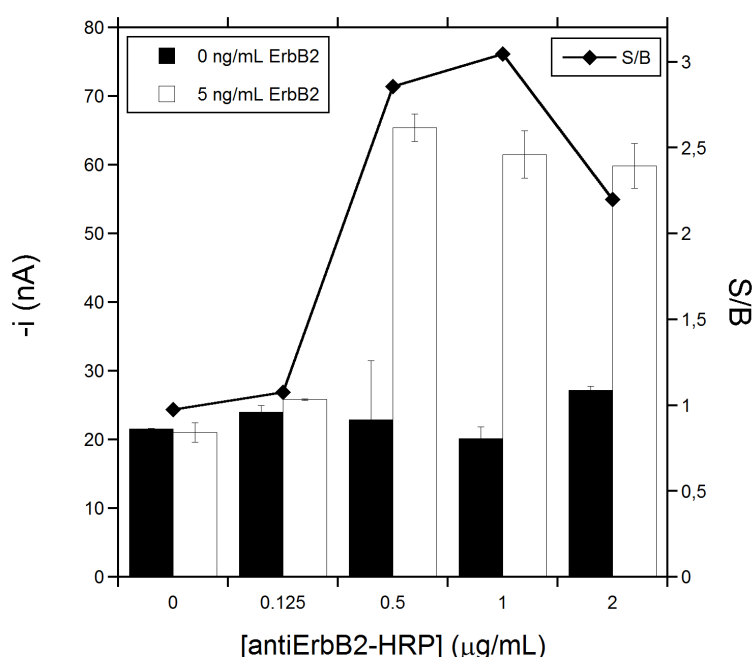
go de concentraciones de analito clínicamente interesantes, diferentes factores cobran protagonismo (por ejemplo, en el caso de una proteína que se encuentre en una concentración muy alta en el organismo, no es necesario optimizar exhaustivamente el ensayo para obtener un LD adecuado). Teniendo esto en cuenta, se ha optimizado el protocolo de fabricación del inmunosensor de ErbB2, incidiendo especialmente en los componentes distintivos del mismo (es decir las concentraciones de los principales componentes del inmunocomplejo: antiErbB2 y antiErbB2–HRP).

En primer lugar se ha tratado de establecer la **concentración óptima de anticuerpo de captura** o primario, ya que disponer de unas MBs convenientemente modificadas para la captura eficiente de la proteína diana es la base del sistema de detección. En la Figura 4.38 se representan las respuestas amperométricas proporcionadas por inmunosensores fabricados a partir de MBs funcionalizadas con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura. Como se ha hecho anteriormente en otras optimizaciones, se han comparado las respuestas amperométricas obtenidas para disoluciones estándares que contienen 0 (B) y 5 (S) ng/mL de ErbB2 y se ha tomado como criterio de selección la relación entre ambas señales (relación S/B). Como puede observarse en la Figura 4.38 la relación S/B aumenta con la concentración de anticuerpo de captura. Teniendo en cuenta la buena sensibilidad del inmunosensor (estos estudios se han realizado a una concentración 3 veces inferior al valor de corte establecido para esta proteína diana en suero) y que el coste final por determinación está directamente relacionado con el gasto de antiErbB2, aunque podría conseguirse una sensibilidad superior empleando mayores concentraciones de anticuerpo de captura, se ha seleccionado una concentración de 10  $\mu$ /mL para estudios posteriores.

También es importante seleccionar la **concentración** adecuada de **anticuerpo secundario** con objeto de proporcionar las máximas señales específicas y de mantener al mínimo las no específicas. La concentración de antiErbB2–HRP se ha optimizado en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 2  $\mu$ g/mL. Como se ha comentado, el empleo de una cantidad excesiva de anticuerpo de captura puede conducir a una saturación de la superficie de las HOOC–MBs (el fabricante de las HOOC–MBs indica una cantidad máxima de 0,3 pg de anticuerpo por partícula), pero no tendría otro efecto que el gasto innecesario de reactivos. Cabe destacar en este punto que mientras que el empleo de una concentración de anticuerpo de captura superior a la óptima puede traducirse en un peor reconocimiento hacia el analito diana por impedimento estérico, en general, una concentración de anticuerpo mayor que la necesaria se traduce en una estabilización de las respuestas específicas y un aumento de las inespecíficas y, por consiguiente, en una disminución de la relación S/B. Como puede observarse en la Figura 4.38, este es precisamente el comportamiento observado en la optimización del anticuerpo de detección.



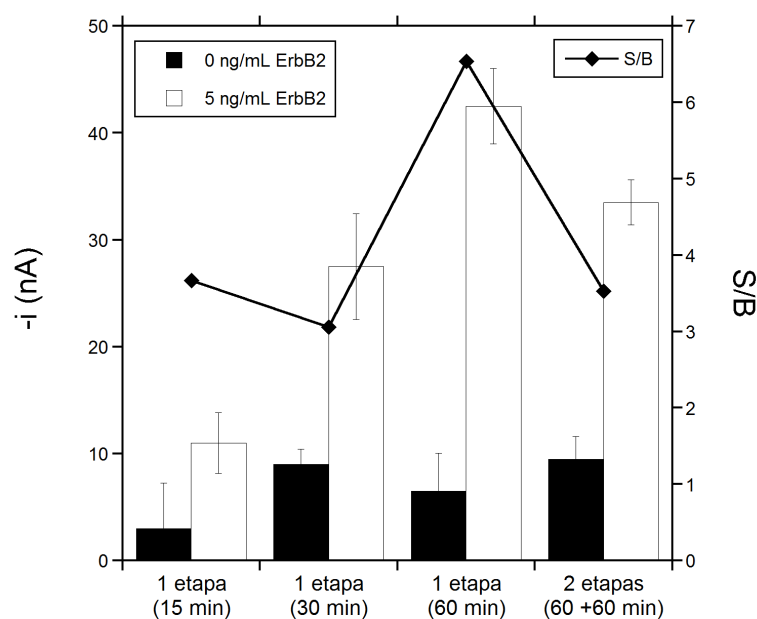
**Figura 4.38:** Efecto de la concentración de antiErbB2 empleada para modificar las MBs en las respuestas amperométricas proporcionadas por inmunosensores preparados a partir de ellas para disoluciones estándar de 0 y 5 ng/mL de ErbB2 y en la correspondiente relación S/B. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



**Figura 4.39:** Efecto de la concentración de antiErbB2-HRP en las respuestas amperométricas proporcionadas por los inmunosensores preparados para disoluciones estándar de 0 y 5 ng/mL de ErbB2 y en la correspondiente relación S/B. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionó para estudios posteriores una concentración de  $1 \mu\text{g/mL}$  de antiErbB2.

Con el objeto de reducir el **tiempo de ensayo** respetando las capacidades analíticas del sensor, se ha evaluado la posibilidad de unificar en un solo paso las dos etapas de la formación del inmunocomplejo (captura selectiva de ErbB2 de la muestra y su posterior marcaje mediante antiErbB2-HRP). Al realizar la formación del inmunocomplejo en un solo paso, todas las reacciones de reconocimiento se dan en disolución y no en superficie (aunque las MBs aumenten mucho la superficie activa, sigue siendo una superficie bidimensional). En este caso, este efecto sobrecompensa a las posibles pérdidas de rendimiento derivadas de la formación no secuencial del inmunocomplejo. Tal y como se puede ver Figura 4.40, en el inmunoensayo unificado resulta ventajoso, tanto en términos de sensibilidad como de especificidad frente al ensayo secuencial original. La mejor sensibilidad del formato que emplea un solo paso puede deberse a una mejor eficiencia de la reacción de inmunoreconocimiento, al estar los inmunoreactivos libres en disolución, minimizándose las limitaciones por difusión o por impedimento estérico que pueden producirse cuando uno de los inmunoreactivos ya se encuentra inmovilizado en la superficie de las MBs.



Tiempo de incubación y combinación de etapas

**Figura 4.40:** Efecto del número de etapas y el tiempo de incubación de las MBs funcionalizadas con el anticuerpo de captura con disoluciones estándares de ErbB2 suplementadas con anticuerpo de detección en las respuestas amperométricas obtenidas y en la correspondiente relación S/B. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

Teniendo en cuenta estos resultados se ha seleccionado para el desarrollo del inmunosensor el formato en un solo etapa, que además de proporcionar mejor sensibilidad, reduce considerablemente el tiempo de ensayo y simplifica enormemente el protocolo de ensayo, lo que resulta muy interesante para su futura implementación en un dispositivo automático.

Con el fin de reducir el tiempo de ensayo también se ha evaluado la influencia del **tiempo de incubación** en la disolución mezcla de analito diana suplementada con anticuerpo de detección (ErbB2) como en anticuerpo secundario (antiErbB2) durante diferentes períodos de tiempo (ver Figura 4.40). La mejor relación S/B se ha obtenido para una incubación de 60 min, valor por debajo del cual se observa una reducción de la sensibilidad de la determinación. En cualquier caso, resulta un tiempo de ensayo muy interesante, teniendo en cuenta que se están midiendo concentraciones muy por debajo del umbral de interés clínico (5 ng/mL) y en un solo paso.

En la Tabla 4.4 se resumen los rangos seleccionados para todas las variables estudiadas y los valores seleccionados como óptimos para cada una de ellas.

Variable experimental	Rango testado	Valor seleccionado
[antiErbB2], $\mu\text{g/mL}$	0–10	10
[antiErbB2–HRP], $\mu\text{g/mL}$	0–2	1
nº pasos	1–2	1
$t_{\text{incubación}}$ , min	15–60	60

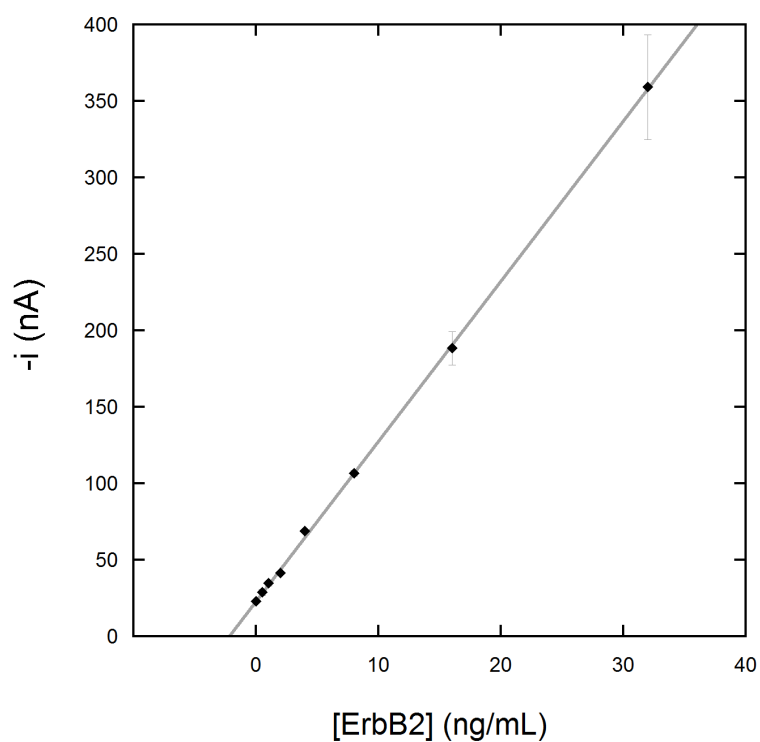
**Tabla 4.4:** Variables experimentales optimizadas para el magnetoinmunoensayo para la detección de ErbB2.

Tras evaluar la influencia de las variables experimentales y optimizar las condiciones óptimas de trabajo se ha caracterizado el **comportamiento analítico** del mismo. Para ello se ha construido una **curva de calibración** empleando disoluciones estándares de ErbB2 con concentraciones comprendidas entre 100 pg/ml y 32 ng/ml. Como se muestra en la Figura 4.41, en este tramo existe una dependencia lineal ( $r=0,999$ ) entre los valores de corriente proporcionados por el inmunosensor y la concentración del estándar de ErbB2 analizado. El ajuste por mínimos cuadrados de los resultados obtenidos proporciona valores de  $0,01046 \pm 0,00007 \mu\text{A mL/ng}$  y de  $0,02330 \pm 0,00002 \mu\text{A}$  para la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente.

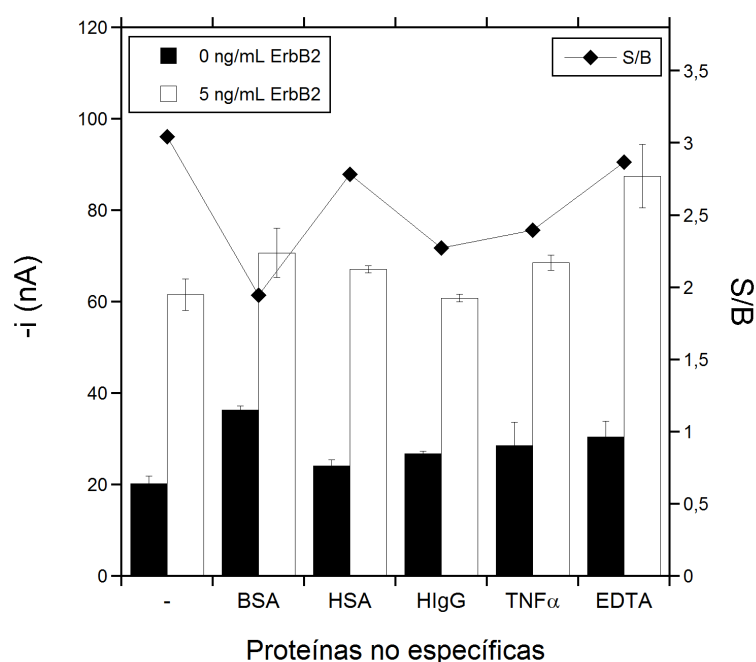
De acuerdo con el criterio expuesto en la Sección 3.4.2.1, se han estimado valores para el LD y el LQ de 26 y 87 pg/ml, valores muy inferiores al valor de corte establecido en suero (Al-Khafaji et al., 2012; Carney et al., 2013; Mahfoud et al., 2014; Marques et al., 2014), (ver Sección 2.1.2.3). Esta característica, junto con las ventajas prácticas inherentes a la técnica de medida, hacen de este biosensor una herramienta ideal para ayudar en el diagnóstico fiable y precoz del cáncer de mama ErbB2+ a través de la determinación de los niveles de este receptor proteico en muestras de suero.

Para evaluar la **selectividad** del magnetoinmunosensor desarrollado se han comparado las respuestas amperométricas que proporciona para disoluciones estándares de 0 y 5 ng/mL de ErbB2 preparadas en ausencia y presencia de varias proteínas y reactivos no específicos que pueden encontrarse a elevadas concentraciones en la muestra objeto de estudio: HSA ( $5,7 \mu\text{g/mL}$ ), el HIgG ( $11,1 \mu\text{g/mL}$ ), el  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/mL), BSA (50 mg/mL) y EDTA (3mM). Siendo el objetivo final la detección en muestras complejas en las que diferentes biomoléculas pueden condicionar la reacción de reconocimiento, es preciso caracterizar este efecto previamente. A fin de cuentas, la selectividad de los anticuerpos empleados influye profundamente en el rendimiento de la detección y su aplicación en un entorno clínico real.

Como se muestra en la Figura 4.42, aunque en presencia de BSA y de EDTA aumentan ligeramente las respuestas inespecíficas y específicas, respectivamente, el inmunosensor discrimina perfectamente entre 0 y 5.0 ng/ml de ErbB2 en presencia de todos estos interferentes lo que nos permite asegurar



**Figura 4.41:** Curva de calibración obtenida con el inmunosensor desarrollado para estándares de ErbB2 preparados en PBST pH 7,5. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



**Figura 4.42:** Selectividad del sensor de ErbB2 frente a altas concentraciones de compuestos no específicos. Los valores de corriente representados corresponde, para cada uno de los casos para muestras con un contenido de 5 ng/mL (positivo) y de 0 ng/mL de ErbB2. También se ha representado el cociente entre estos dos valores para calcular la relación señal/ruido. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

que su presencia no representa un problema para la aplicabilidad del mismo al análisis de muestras de suero como se demostrará a continuación.

Aunque la sensibilidad y la selectividad del sensor sean más que suficientes para la aplicación para la que ha sido diseñado, existen otros factores igualmente importantes que condicionan su utilidad práctica como la **reproducibilidad** entre las medidas proporcionadas por 5 inmunosensores diferentes preparados de la misma manera para una disolución estándar de 5 ng/ml de ErbB2. El valor de RSD obtenido de 5,6% confirma la reproducibilidad de los procesos empleados para la fabricación del inmunosensor y la medida amperométrica.

Una de las ventajas principales del inmunosensor desarrollado en este trabajo es el excelente comportamiento que demuestra en el análisis con muestras complejas, como puede ser el suero. Con el fin de demostrar la aplicabilidad práctica de este inmunosensor se han empleado dos tipos de muestras diferentes: un suero humano comercial y dos sueros de pacientes sanos (Biodonostia Health Research Institute).



Muestra	ELISA (ng/mL)	Magnetoimmunosensor (ng/mL)
Sigma	24,5±0,8 RSD <sub>n=3</sub> =1,3 %	26±2 RSD <sub>n=3</sub> =3,3 %
Paciente n°1	14,6±0,3 RSD <sub>n=3</sub> =0,7 %	15±1 RSD <sub>n=3</sub> =2,9 %
Paciente n°2	15,5±0,6 RSD <sub>n=3</sub> =1,6 %	16±2 RSD <sub>n=3</sub> =5,7 %

**Tabla 4.5:** Determinación de ErbB2 en diferentes muestras de suero humano mediante el inmunosensor propuesto y comparado con un ELISA comercial. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

Como se describe en la Sección 3.4.1 y tras no observarse la presencia de efecto matriz para realizar las determinaciones en suero las respuestas amperométricas proporcionadas para las muestras diluidas al 40 % (en PBS suplementado con 1 M de NaCl, 2 % Tween y 0,5 % de BSA) se interpolan en el calibrado obtenido para estándares de ErbB2 (Figura 4.41). Los resultados proporcionados por el inmunosensor se compararon con obtenidos al analizar las muestras de suero anteriores con los que proporciona un kit ELISA comercial (SINO Biological), basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos. Los resultados obtenidos, comparados en la Tabla 4.5 demuestran la buena correlación existente entre ambas metodologías y confirman nuevamente la elevada selectividad de los inmunoreactivos empleados. Son destacables también los bajos valores de RSD obtenidos en el análisis de estas muestras, lo que confirma la buena reproducibilidad de la metodología también para el análisis de muestras de elevada complejidad como el suero. Todos estos resultados permiten concluir que el inmunosensor desarrollado permite la determinación selectiva, sensible y fiable del contenido endógeno de ErbB2 en muestras de suero.

La excelente aplicabilidad demostrada para el análisis de muestras de suero humano nos llevó a evaluar el potencial del inmunosensor desarrollado para la determinación en otro tipo de muestras complejas poco exploradas hasta la fecha con biosensores electroquímicos.

Así, se evaluó la aplicabilidad para la determinación en lisados celulares de líneas celulares caracterizadas por su sobreexpresión de ErbB2 (SK-BR-3) y con niveles normales de este receptor (MCF-7 y MDA-MB-436). Las diferentes muestras se han preparado siguiendo el protocolo descrito en la Sección 3.3.11, y las determinaciones se han realizado de acuerdo con el procedimiento habitual empleando 2.5  $\mu$ g de lisado crudo por cada determinación, una cantidad bastante inferior a la que requieren otras metodologías. Los lisados preparados se han caracterizado por electroforesis en gel empleándose geles de SDS-PAGE 10 % por tinción con Coomassie Blue e inmunotinción. Los resultados mostrados en la Figura 4.43 demuestran claramente la sobreexpresión de ErbB2 en las células SK-BR-3.

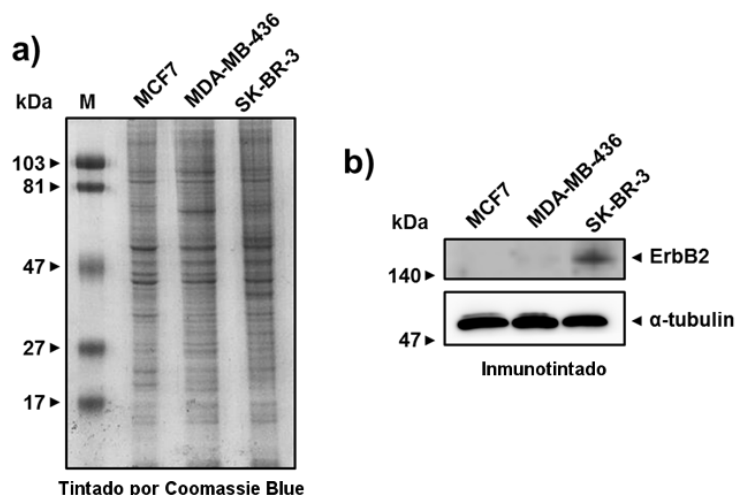
Muestra	ELISA	Magnetoimmunosensor
MCF-7	(69±5) RSD <sub>n=3</sub> =3,1 %	(67±14) RSD <sub>n=3</sub> =8,7 %
MDA-MB-436	(65±12) RSD <sub>n=3</sub> =7,3 %	(64±6) RSD <sub>n=3</sub> =5,5 %
SK-BR-3	(198±12) RSD <sub>n=3</sub> =2,5 %	(205±23) RSD <sub>n=3</sub> =4,5 %

**Tabla 4.6:** Detección de ErbB2 (en pg/ $\mu$ g) en lisados celulares provenientes de diferentes líneas celulares por medio del magnetoimmunosensor desarrollado en este trabajo y comparado con un ELISA, ambos empleando los mismos inmuno-reactivos. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  (n=3).

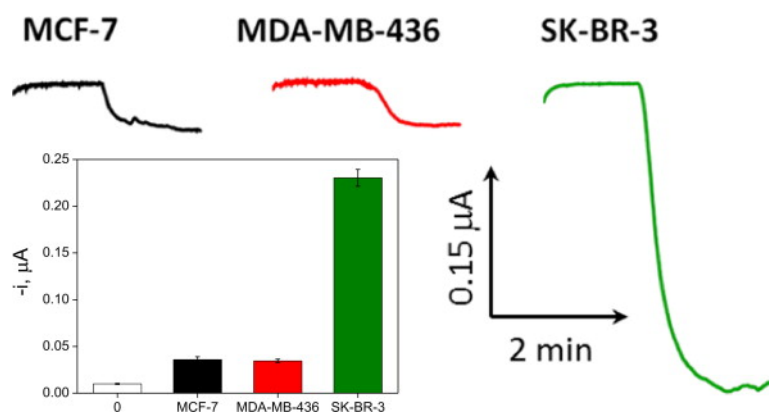
En la Figura 4.44 se muestran los resultados del análisis de los diferentes lisados. Se puede apreciar claramente la diferencia entre las respuestas amperométricas obtenidas para las diferentes líneas celulares. En concordancia con lo descrito en literatura, la respuesta amperométrica que proporciona el inmunosensor es significativamente superior para la línea celular que sobreexpresa ErbB2 (SKBR-3), lo que demuestra la idoneidad de la técnica para evaluar si una muestra celular sobreexpresa o no ErbB2.

Con el fin de evaluar la existencia de efecto matriz en la determinación en lisados celulares se han comparado la pendiente del calibrado obtenido para disoluciones estándares con los que resultan al analizar disoluciones preparadas con distintas cantidades de lisados celulares y suplementadas con concentraciones superiores de estándares de ErbB2 (hasta los 25 ng/mL). La comparación estadística de los valores de las pendientes demuestra la ausencia de efecto matriz significativo si la cantidad de lisado empleado en el análisis es igual o inferior a 2,5  $\mu$ g, lo que permite realizar las determinaciones por simple interpolación en el calibrado de estándares. La comparación de los resultados proporcionados por el inmunosensor y el kit ELISA comercial (Tabla 4.6) pone de manifiesto de nuevo la buena correlación existente entre ambas metodologías. Es importante destacar también que el contenido de proteína diana determinado está de acuerdo con el obtenido empleando la metodología SPR descrita en el capítulo anterior de esta tesis doctoral. Esta concordancia de resultados empleando metodologías tan diversas pone de manifiesto la solidez del magnetoimmunosensor desarrollado.

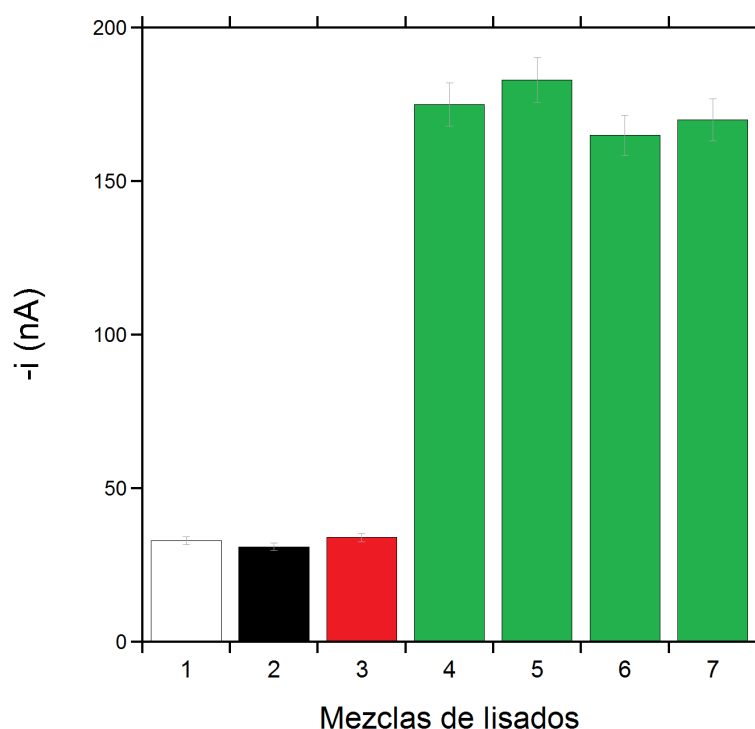
Con objeto de demostrar que no existe **interferencia entre las diferentes líneas celulares**, se analizaron varias mezclas de estas: SK-BR-3 + MCF-7, SK-BR-3 + MDA-MB-436 y SK-BR-3 + MCF-7 + MDA-MB-436 (1,25  $\mu$ g de cada). Tal y como se observa en la Figura 4.45, mientras que las líneas celulares ErbB2 negativas (MCF-7 y MDA-MB-436) producen señales comparables a los blancos, aquellas con lisados provenientes de células ErbB2 positivas (SK-BR-3) ofrecen valores mucho mayores. Estos últimos, además, son muy similares a los obtenidos al medir únicamente lisados de SK-BR-3, lo que indica claramente el nivel indetectable de ErbB2 presente en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-436



**Figura 4.43:** Clasificación de los diferentes lisados celulares en función de su nivel de expresión de ErbB2 por medio de Western Blot. Se han medido muestras con un contenido de 20  $\mu\text{g}$  y 50  $\mu\text{g}$  de lisado de las diferentes líneas celulares (MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3) de manera independiente por SDS-PAGE 10% y tinto con Coomassie Blue (a) o transferencia a membranas de nitrocelulosa y capturados con anticuerpos específicos antiErbB2 (b). Se indican las masas moleculares de las proteínas marcadoras estándares en kD.



**Figura 4.44:** Determinación de ErbB2 en lisados celulares. Las respuestas amperométricas han sido obtenidas con el magnetoinmunosensor para muestras en ausencia y en presencia de 2,5  $\mu\text{g}$  de lisado celular. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20 \text{ V}$  vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).

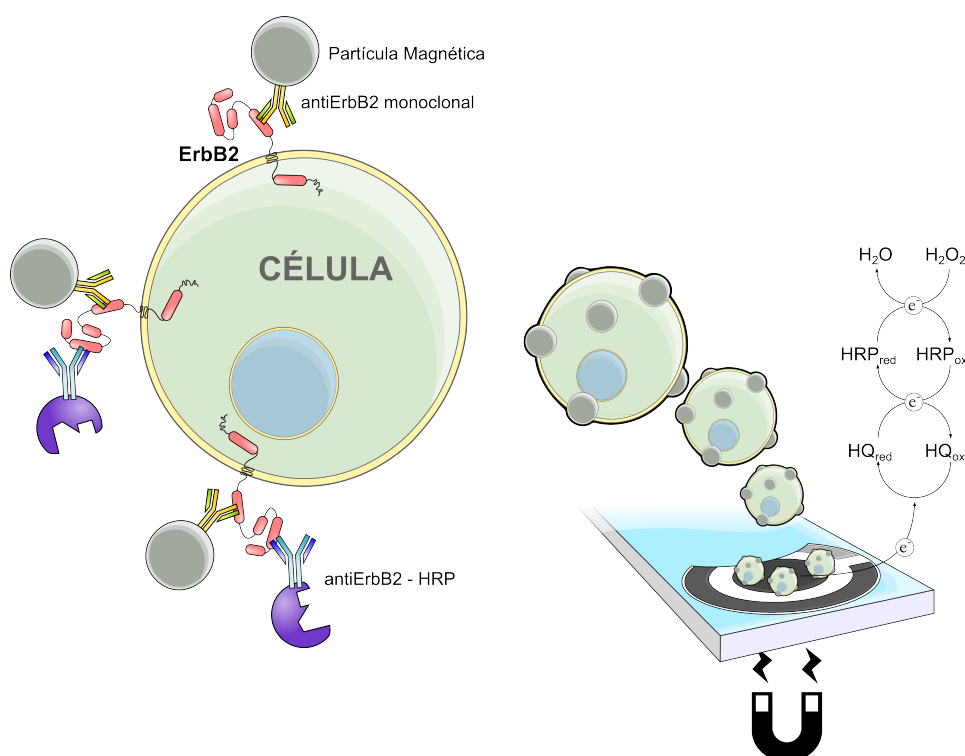


**Figura 4.45:** Determinación de ErbB2 en lisados celulares. Respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetoimmunosensor en ausencia (1) y en presencia de 1,25  $\mu\text{g}$  de lisados de MCF-7 (2), MDA-MB-436 (3) y SK-BR-3 (4) y mezclas de lisados SK-BR-3 + MCF-7 (5), SK-BR-3 + MDA-MB-436 (6) y SK-BR-3 + MCF-7 + MDA-MB-436 (7) (1,25  $\mu\text{g}$  de cada lisado celular). Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20 \text{ V}$  vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times \text{SD}$  ( $n=3$ ).

y que su presencia no interfiere para nada en la determinación de ErbB2 en los lisados de células positivas.

Cabe mencionar que no se han empleado cantidades mayores de lisado por evitar el efecto matriz observado al emplear más de 2,5  $\mu\text{g}$  de muestra por medida. Al mismo tiempo, un dato que confirma la baja interferencia del resto de lisados es el valor de concentración de ErbB2 calculado (176 – 209 pg/mL) y que está de acuerdo con el obtenido anteriormente en la determinación individual de lisados de SKBR-3 (consultar Tabla 4.6). De todos estos ensayos puede concluirse que las medidas son altamente selectivas, incluso en situaciones en las que la muestra problema contiene una gran cantidad de componentes no específicos.

Las ventajas del magnetoimmunosensor descritas cobran una importancia especial cuando se compara con los métodos inmunoquímicos convencionales, como el Western Blot que, debido a su baja sensibilidad, requieren de unos



**Figura 4.46:** Representación esquemática del protocolo empleado para la determinación *in-vitro* de ErbB2 directamente en células completas. Las MBs funcionalizadas y el antiErbB2–HRP se unen específicamente a las células con sobreexpresión de ErbB2, para atraerlas magnéticamente y realizar la determinación amperométrica final.

50  $\mu\text{g}$  de lisado celular para poder detectar la proteína diana. Esto contrasta con las bajas cantidades de muestra requeridas por el magnetoinmunsensor, que produce señales amperométricas detectables incluso con cantidades inferiores a 1  $\mu\text{g}$  de lisado de células que sobreexpresen ErbB2.

Todos estos resultados confirman que el inmunsensor desarrollado proporciona de manera rápida y sencilla datos cuantitativos complementarios a los proporcionados por otras metodologías, muy útiles para diagnóstico temprano y fiable de cáncer de mama, que pueden resultar también de interés con fines de pronóstico.

Teniendo en cuenta que la proteína diana es un receptor extracelular también se evaluó la factibilidad de aplicar la metodología desarrollada a la determinación en célula entera de acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 4.46.

Los resultados de estos experimentos, de acuerdo con los resultados obtenidos en los correspondientes lisados celulares, proporcionaron respuestas

Línea celular	[ErbB2], fg/célula	Receptores ErbB2 por célula $\times 10^{-3}$
MCF-7	6,9 $\pm$ 0,8	22 $\pm$ 2
MDA-MB-436	1,4 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,5
SK-BR-3	162 $\pm$ 18	530 $\pm$ 60

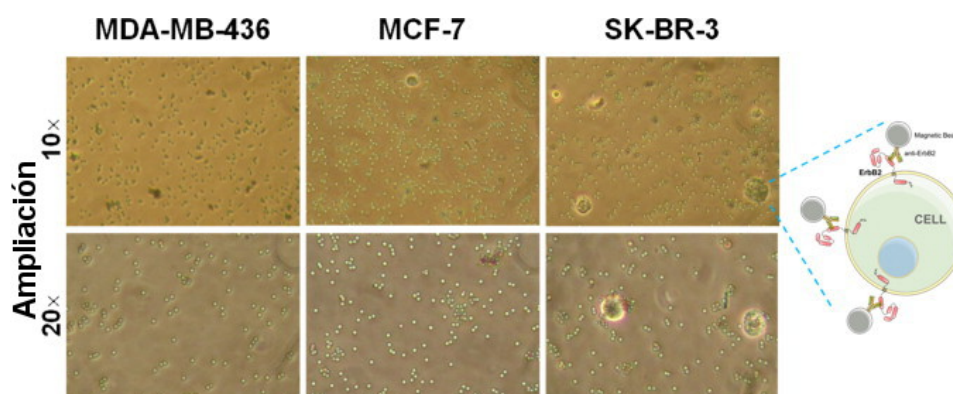
**Tabla 4.7:** Detección de ErbB2 directamente en célula para diferentes líneas celulares, junto con un cálculo aproximado de la cantidad de receptores por célula.

amperométricas significativamente superiores para las células SK-BR-3, lo que conforma la aplicabilidad del este biosensor en este tipo de determinaciones. Tras no observarse la existencia de efecto matriz en cultivos de célula entera se ha estimado el contenido de proteína diana por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en el calibrado de estándares de ErbB2. A partir del valor de concentración de proteína calculado (en unidades de ng/mL), se ha estimado el número de receptores por célula a partir del número de células empleadas en el ensayo junto con el peso molecular del receptor ErbB2 (185 kDa) y el número de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ). Los valores calculados (Tabla 4.7) están de acuerdo con los obtenidos por otros autores empleando otras metodologías:  $(5-6) \times 10^5$  receptores/célula para las células SK-BR-3 (Shi et al., 2009; Zhang et al., 2011) y  $(1-2) \times 10^4$  receptores/célula para las células MCF-7 (Aguilar et al., 1999; Shi et al., 2009).

Con objeto de demostrar la captura selectiva de las células a través del receptor ErbB2 se observaron al microscopio óptico las MBs obtenidas tras la incubación con los tres cultivos celulares. Las micrografías, mostradas en la Figura 4.47 muestran claramente que la cantidad de células capturadas es mucho mayor para el tipo celular SK-BR-3 que para los tipos MDA-MB-436 y MCF-7. El número de complejos célula-MBs observado mediante el microscopio a 10 aumentos para la línea celular ha sido muy reducido, mientras que para la MDA-MB-436 ha sido prácticamente nulo.

Estos resultados demuestran la capacidad de las HOOC-MBs funcionalizadas específicamente como herramienta de discriminación celular a través de proteínas de la membrana celular, ya sea para su posterior detección o para otros fines en los que resulte de interés el aislamiento selectivo de células con perfiles de receptores concretos.

Asimismo, es importante destacar que es la primera vez que se realiza la detección de ErbB2 directamente sobre células intactas, todo ello por medio de un magnetoinmunosensor electroquímico y empleando inmunoreactivos procedentes de un kit ELISA comercial. Precisamente en una comparación directa con un kit espectrofotométrico ELISA para el análisis de ErbB2 (que puede considerarse el método de detección inmunoquímico de referencia), el magnetoinmunosensor resulta ventajoso en varios aspectos, ya que para obtener sensibilidades similares, se puede prescindir de equipamiento costoso y se evi-



**Figura 4.47:** Micrografías obtenidas al incubar diferentes tipos de células (MDA-MB-436, MCF-7 y SK-BR-3) con HOOC-MBs funcionalizadas con antiErbB2. Pueden observarse los complejos célula-MBs que se forman en los tipos celulares que sobreexpresan receptores ErbB2 en su superficie.

tan procesos que involucran múltiples etapas (Mahfoud et al., 2014), que resultan complicados y laboriosos. Otro punto importante a destacar en relación con los kits ELISA disponibles comercialmente, es que requieren que el analito esté disuelto directamente en la muestra, y por tanto, aunque resultan útiles para el análisis de muestras biológicas como el suero, plasma u orina, el procedimiento de medida se complica para su aplicación en la determinación de proteínas en células o tejidos, ya que requieren de un paso de lisis y preparación de muestra adicional previo. Existen unos pocos test ELISA comerciales específicamente desarrollados para la detección de ErbB2 en células intactas, pero requieren un procedimiento alternativo y más complejo que el formato *sandwich* habitual y que incluye pasos de siembra, desactivación, fijado y permeabilización de las células en el fondo de cada pocillo de la placa.

Con el objetivo de situar la técnica de detección desarrollada en este trabajo en perspectiva, se ha comparado el rendimiento del biosensor presentado en este trabajo para la detección de ErbB2 con otros inmunosensores electroquímicos existentes y se han resumido sus principales características analíticas en la Tabla 4.8. Como puede observarse, el sensor desarrollado ofrece uno de los mejores LD. En la comparación con otros sensores más sensibles (Zhu et al., 2013c; Emami et al., 2014), cabe destacar la simplicidad inherente a la metodología de detección aquí presentada. Por otro lado, en contraste con otros métodos empleados para la determinación de ErbB2 en lisados celulares (Mucelli et al., 2008) y células de cáncer de mama (Zhu et al., 2013c), resulta imprescindible subrayar que la solución propuesta en este trabajo, además de que no requiere el empleo de excesivos reactivos, ni de complicadas modificaciones de la superficie electródica, ni de reactivos para el marcaje que conllevan complejos y laboriosos protocolos de preparación, proporciona los resultados en el menor tiempo de ensayo. Estas ventajas resultan especialmente relevantes pa-

ra la implementación futura del inmunosensor desarrollado en un dispositivo POC.



Metodología	Técnica	Muestra	Rango de concentraciones	Sensibilidad	LD (pg/mL)	Tiempo de ensayo	Referencia
Inmunosensor tipo <i>sándwich</i> nanoestructurado sobre conjuntos nanoestructurados preparados sobre membranas de policarbonato	CV	Lisados de células y tejidos tumorales	–	–	40 ng/mL	7 h 10 min	Mucelli et al. (2008)
Magnetoinmunoensayo tipo <i>sándwich</i> sobre MBs con Proteína A y marcado con AP	DPV	Suero	6–15 ng/mL	$9 \times 10^{-8}$ A mL/ng	6 ng/mL	130 min	Al-Khafaji et al. (2012)
Inmunosensor construido inmovilizando covalentemente antiErbB2 sobre una capa de nanocompósito de (2,5-bis(tienil)-1 H-pirrol-(ácido p-benzóico)) sobre AuNPs combinado con AuNPs conjugadas con hidracina y aptámeros	SWSV	Suero y células de cáncer de mama	0,1 pg/mL–100 ng/mL	1.12 $\mu$ A mL/ng	0,037 pg/mL	≈18 h + 54 h (preparación)	Zhu et al. (2013c)
Inmunoensayo tipo <i>sándwich</i> sobre electrodos serigrafiados de oro modificados con AuNPs	LSV	Suero	15–100 ng/mL	33,56 $\mu$ A mL/ng	4,4 ng/mL	2 h 50 min	Marques et al. (2014)
Inmunosensor <i>libre de marca</i> empleando electrodos de oro modificados con nanopartículas de óxido de hierro cubiertas de antiErbB2	DPV	Suero	0,01–10 ng/mL y 10–100 ng/mL	5.921 mA mL/ng	0,995 pg/mL	≈44 h	Emami et al. (2014)
Inmunoensayo tipo <i>sándwich</i> sobre electrodos serigrafiados y basado en el uso de <i>nanobodies</i>	CA	Lisados celulares contaminados	1–200 $\mu$ g/mL	–	1 $\mu$ g/mL	≈3 h	Patris et al. (2014)

Magnetoimmunoassay tipo <i>sándwich</i> sobre HOOC-MBs y con HRP como marcador enzimático	CA	Suero, lisados celulares y células de cáncer de mama	0,1–32 ng/mL	0,01 $\mu$ A mL/ng	26 pg/mL	70 min	Este trabajo
---	----	--	--------------	--------------------	----------	--------	--------------

**Tabla 4.8:** Características relevantes de otros inmunosensores electroquímicos desarrollados para la determinación de ErbB2

- Voltamperometría Cíclica (CV)
- Voltamperometría Diferencial de Impulsos (DPV)
- Voltamperometría de Redisolución de Onda Cuadrada (SWSV)
- Voltamperometría de Barrido Lineal (LSV)
- Cronoamperometría (CA)

## ER $\alpha$

Otro de los principales biomarcadores implicados en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama, junto con el ErbB2 y el PR, es el ER $\alpha$ . En esta sección se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de un magnetoinmunosensor amperométrico para la determinación de este importante receptor hormonal, cuya implicación en el cáncer de mama ha sido ampliamente detallada en la Sección 2.1.2.3.

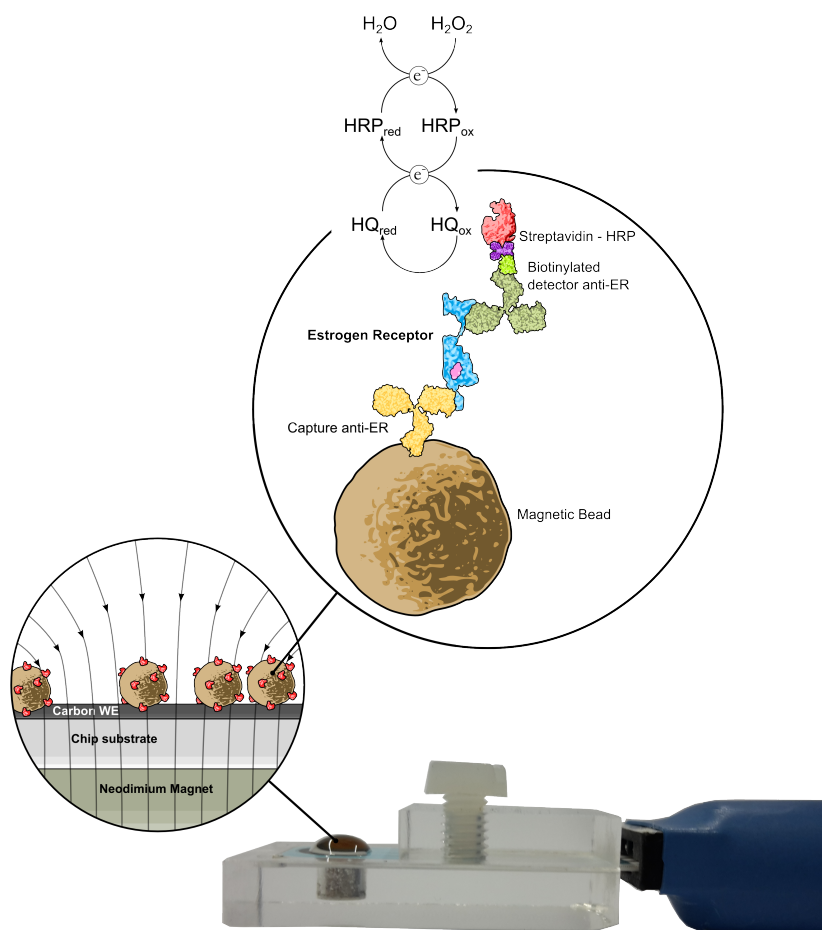
Con el objeto de desarrollar una plataforma de multideterminación para diagnóstico y seguimiento de cáncer de mama, es necesario optimizar y caracterizar el comportamiento analítico de plataformas para determinación individual. Para ello se ha desarrollado un magnetoinmunosensor amperométrico para la determinación de ErbB2 basado en un formato tipo sándwich que emplea un anticuerpo de detección marcado con HRP implementado sobre HOOC-MBs y realizando la transducción amperométrica como se ha descrito anteriormente empleando el sistema HQ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.48). Tras optimizar las variables experimentales involucradas y caracterizar el comportamiento analítico del magnetoinmunosensor se ha evaluado su aplicabilidad en muestras biológicas complejas: suero humano, lisados celulares y células enteras.

Los principales parámetros experimentales involucrados en la preparación de la muestra y la posterior detección han sido cuidadosamente optimizados, con el doble objetivo de obtener una sensibilidad y selectividad adecuadas, manteniendo siempre un compromiso con el tiempo total de ensayo y coste por medida. Para esta evaluación, se han registrado y comparado las señales amperométricas obtenidas con el inmunosensor para disoluciones estándar que contienen 0 y 1 ng/mL de proteína ER $\alpha$ .

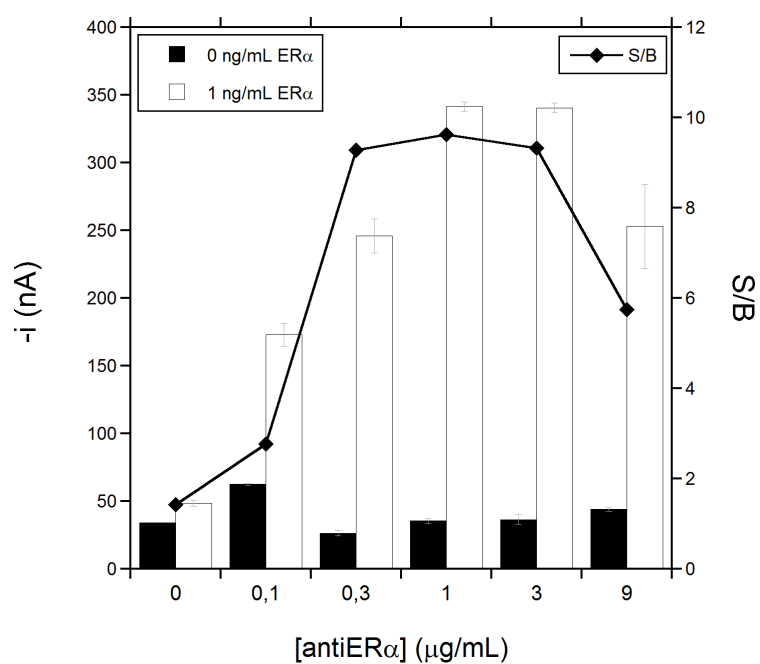
En primer lugar se ha optimizado la **concentración de anticuerpo de captura** con el fin de asegurar la máxima eficiencia en el reconocimiento y por tanto la mejor sensibilidad del inmunosensor resultante.

La Figura 4.49 muestra la dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con los inmunosensores fabricados a partir de MBs modificadas con concentraciones de antiER $\alpha$  en el rango comprendido entre 0 y 9  $\mu$ /mL. Como puede observarse, la relación S/B aumenta con la concentración de antiER $\alpha$  hasta un valor de 3  $\mu$ /mL y disminuye para concentraciones superiores. Estos resultados pueden atribuirse a la disminución de la eficiencia del inmunoreconocimiento por impedimentos estéricos cuando se inmovilizan cantidades elevadas de anticuerpo. A la vista de estos resultados y como compromiso entre sensibilidad y coste por ensayo se ha seleccionado una concentración de antiER $\alpha$  de 1  $\mu$ /mL para estudios posteriores.

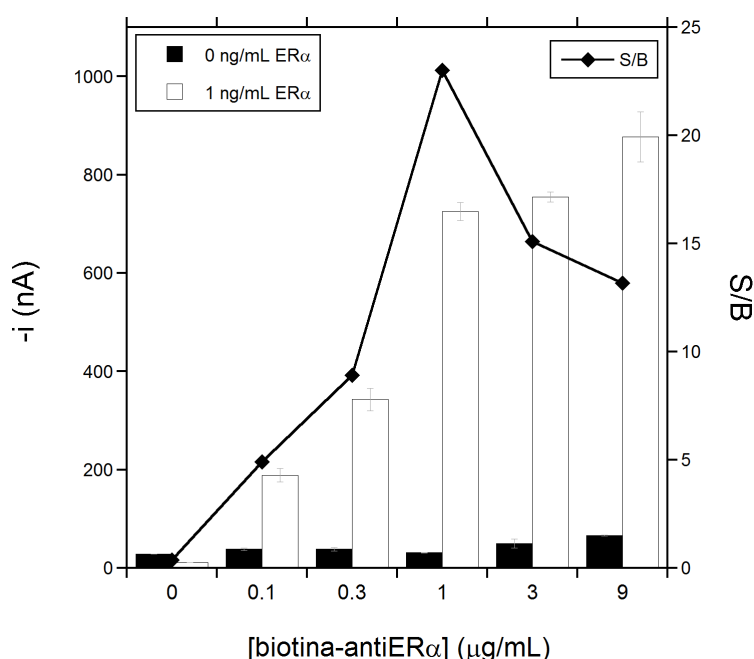
La influencia de la **concentración de anticuerpo de detección** se ha evaluado en el intervalo comprendido entre 0 y los 9  $\mu$ g/mL de biotina-antiER $\alpha$ .



**Figura 4.48:** Representación esquemática del proceso de detección de ER $\alpha$  por medio del magnetoinmunosensor. Sobre las HOOC-MBs funcionalizadas específicamente con antiER $\alpha$ , se forma el inmunocomplejo tipo sandwich marcado enzimáticamente con HRP. Las MBs modificadas se capturan sobre el WE por medio de un imán permanente para realizar la cuantificación amperométrica final, por medio del sistema redox HRP-HQ-H $_2$ O $_2$ .



**Figura 4.49:** Efecto de la concentración de antiERα en las respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetoinmunoensensor desarrollado para estándares de 0 y 1 ng/mL de ERα. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

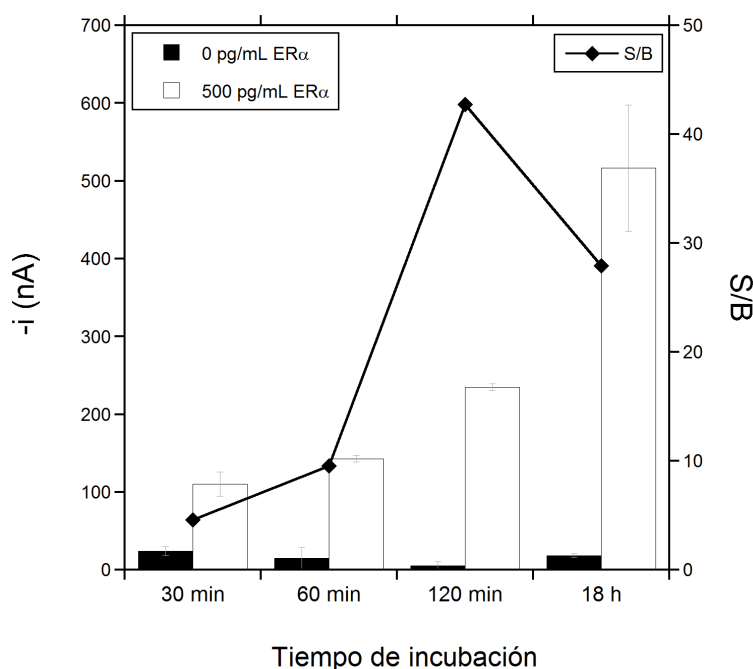


**Figura 4.50:** Efecto de la concentración de biotina-antiERα en las respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetoinmunsensor desarrollado para estándares de 0 y 1 ng/mL de ERα. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

Como puede verse en la Figura 4.50, las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de ERα aumentan con la concentración de anticuerpo de detección hasta un valor de  $1 \mu\text{g/mL}$  y se estabilizan para concentraciones superiores. Cabe destacar que el empleo de estas concentraciones superiores de anticuerpo de detección se traduce también en mayores respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de ERα; en base al criterio de selección habitual S/B, se ha optado por  $1 \mu\text{g/mL}$  como concentración óptima de anticuerpo de detección.

El componente final del inmunocomplejo (ver Figura 4.48) es la SAV-HRP, que reacciona con la biotina unida al anticuerpo secundario biotina-antiERα por medio de la reacción de reconocimiento específica biotina – SAV. La dependencia de esta variable ya se ha evaluado anteriormente (4.1.2.1) y no se ha considerado necesario repetir el proceso de optimización.

Con objeto de desarrollar un ensayo rápido y fácilmente integrable en un dispositivo POC se decidió enfocar los esfuerzos en el estudio del tiempo de incubación de las antiERα-MBs con una disolución estándar de ERα para la captura eficiente de la proteína diana y en la posibilidad de combinar todas las etapas implicadas en el funcionamiento del inmmunosensor, lo que además de



**Figura 4.51:** Efecto del tiempo de incubación de las anti $ER\alpha$ -MBs con disoluciones estándares de  $ER\alpha$  de 0 y 500 pg/mL suplementadas con anticuerpo de detección en las respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetoinmunosensor desarrollado. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

reducir significativamente el tiempo de ensayo, simplificaría el protocolo de medida.

Como puede observarse en la Figura 4.51, los mejores resultados se obtuvieron empleando los mayores tiempos de incubación, lo que indica que en las condiciones experimentales empleadas la cinética de la reacción de afinidad entre el anti $ER\alpha$  inmovilizado y el  $ER\alpha$  en disolución es lenta. Estos resultados demuestran que para escenarios en los que un LD resulte imprescindible, siempre puede emplearse el recurso de aumentar los tiempos de incubación, sin embargo, y por cuestiones prácticas, se ha optado por una incubación de la muestra de 60 minutos, considerando este tiempo un compromiso adecuado entre sensibilidad y rapidez de la detección. En cualquier caso, este parámetro puede ajustarse dependiendo de la aplicación, acortándose para situaciones en las que el tiempo de respuesta sea un factor determinante o incrementándose en el caso de requerir cuantificaciones más sensibles.

La segunda estrategia para reducir el tiempo de la determinación ha sido la de fusionar varios de los pasos de formación del inmunocomplejo. Anteriormente, esta aproximación ha dado muy buenos resultados, mejorando incluso la eficiencia de la detección (ver Sección 4.2.2.1) y por tanto se han probado di-

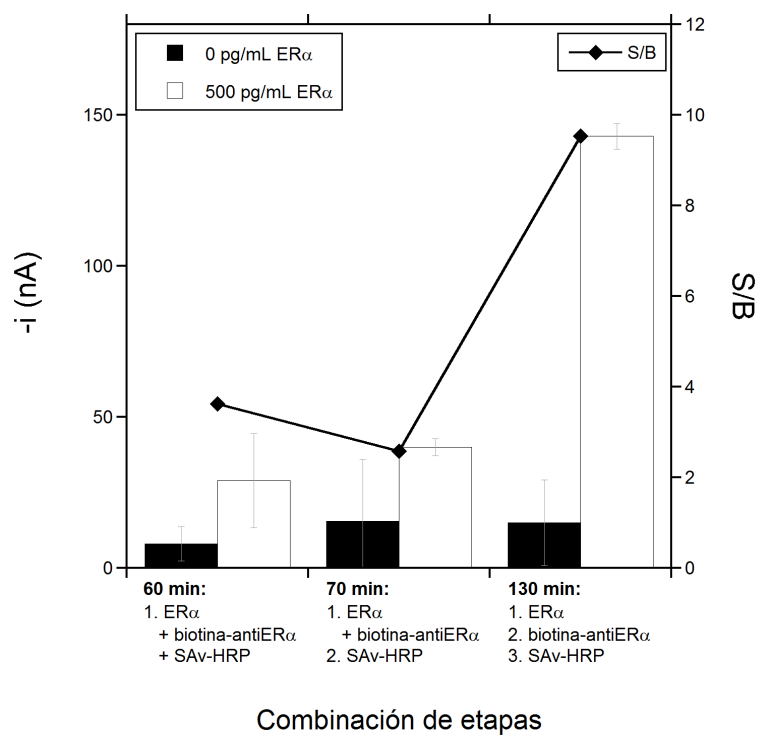
ferentes configuraciones con el objetivo de acortar y simplificar en la medida de lo posible el proceso de detección del ER $\alpha$ , partiendo siempre de HOOC-MBs funcionalizadas específicamente con antiER $\alpha$ :

1. Inmunoensayo en tres pasos. Incubaciones sucesivas con disoluciones del estándar de ER $\alpha$  (60 min), biotina-antiER $\alpha$  (60 min) y SAV-HRP (10 min). Tiempo total de ensayo: 130 min.
2. Inmunoensayo en dos pasos. Incubación con la disolución de estándar de ER $\alpha$  suplementada con la concentración óptima de biotina-antiER $\alpha$  (60 min) seguida de una etapa de incubación con la disolución de SAV-HRP (10 min). Tiempo total de ensayo: 70 min.
3. Inmunoensayo en un solo paso. Incubación en una disolución mezcla del estándar de ER $\alpha$  suplementada con biotina-antiER $\alpha$  y SAV-HRP (60 min). Tiempo total de ensayo: 60 min.

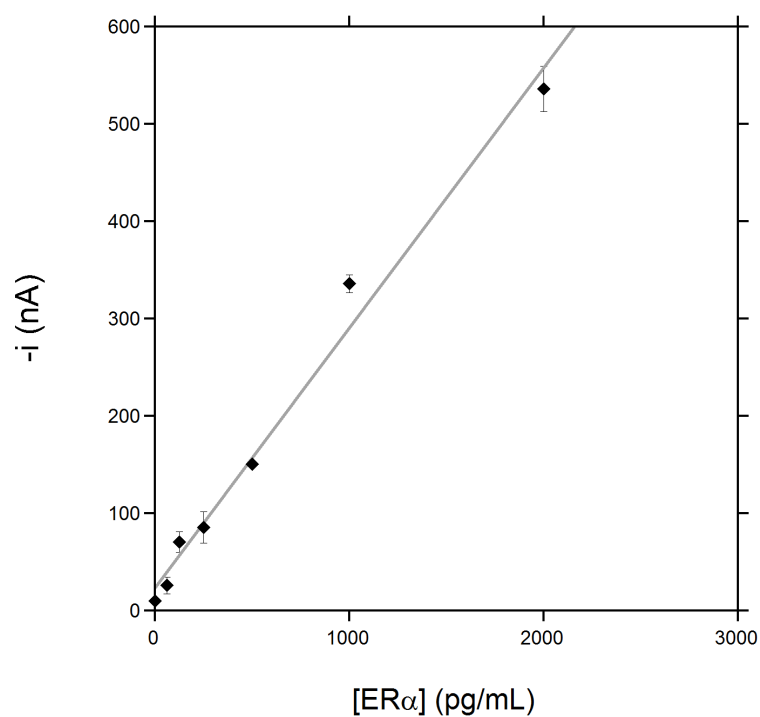
Como puede observarse en la Figura 4.52, el formato basado en el empleo de etapas individuales es el que proporciona los mejores resultados con los inmunoreactivos seleccionados y en las condiciones optimizadas. Estos resultados contrastan con la mejor eficiencia observada para el inmunosensor de ErbB2 cuando se realiza en un solo paso, lo que puede atribuirse al hecho de emplear en ese caso un anticuerpo marcado directamente con HRP. La diferente cinética de las reacciones biotina-SAV y antiER $\alpha$ -ER $\alpha$ , mucho más rápida para la primera de ellas, puede explicar que cuando se emplea un solo paso, el anticuerpo secundario biotinilado se conjugue demasiado rápido con SAV-HRP y se dificulte el reconocimiento de ER $\alpha$ . En vista de estos resultados se decidió preparar el inmunosensor siguiendo el formato secuencial en 3 etapas.

Con la configuración seleccionada y los parámetros más influyentes del inmunoensayo optimizados, se han evaluado las **características analíticas** del sensor de ER $\alpha$ . Para ello, se ha construido una curva de calibración con estándares de ER $\alpha$  preparados en PBST en el rango de concentraciones comprendido entre 63–2000 pg/mL. Como puede observarse en la Figura 4.53, la curva de calibración muestra una relación lineal entre la corriente medida y la concentración de ER $\alpha$  en todo el intervalo de concentraciones ensayado. El ajuste de los resultados experimentales a una regresión lineal proporciona una pendiente de  $0,27 \pm 0,01$  nA·mL/pg y una ordenada en el origen de  $20 \pm 10$  nA ( $r=0,990$ ). A partir de esta curva de calibración, también se ha calculado un LD de 19 pg/mL y un LQ de 63 pg/mL empleando los criterios expuestos en la Sección 3.4.2.1. Estos valores confirman que el inmunosensor ofrece una elevada sensibilidad y un amplio rango de determinación, lo que lo convierte en una herramienta muy útil para la cuantificación de ER $\alpha$ .

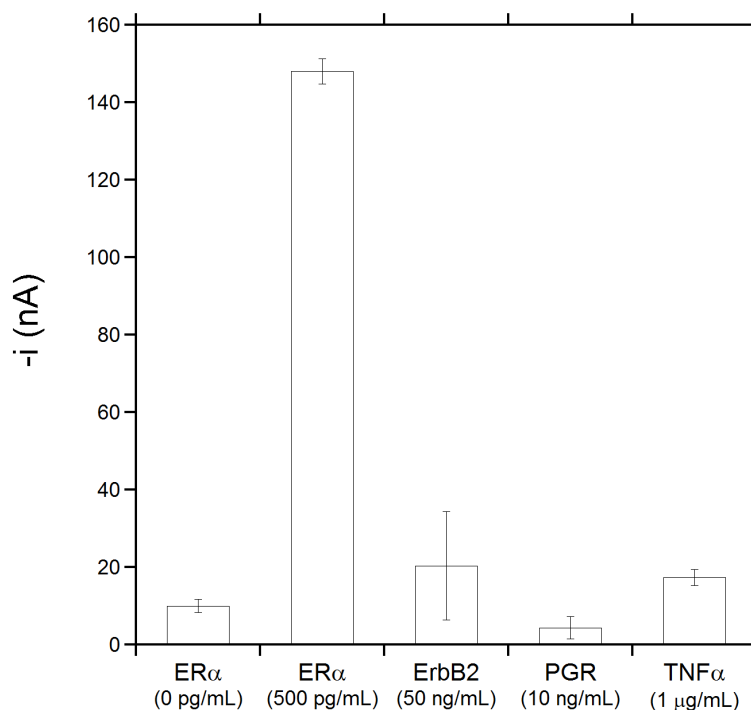




**Figura 4.52:** Efecto del número de etapas empleadas en el inmunoensayo en las respuestas amperométricas obtenidas con disoluciones estándares de  $ER\alpha$  de 0 y 500 pg/mL. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



**Figura 4.53:** Curva de calibración obtenida con el magnetoinmunosensor desarrollado para disoluciones estándar de  $ER\alpha$  preparadas en PBST pH 7,5. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).



#### Selectividad frente a diferentes proteínas

**Figura 4.54:** Respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetoinmunosensor para disoluciones estándar de 0 500 pg/mL de ERα, 50 ng/mL de ErbB2, 10 ng/mL de PR y 1 μg/mL de TNFα. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  (n=3).

Para evaluar la **reproducibilidad** se ha comparado las respuestas amperométricas proporcionadas por 5 magnetoinmunosensores diferentes (preparados de la misma manera) para disoluciones estándar de ERα de 1 ng/mL. El valor de RSD obtenido de 2,5 % es indicativo de la elevada reproducibilidad de los protocolos implicados en la realización del magnetoinmunoensayo y en la medida amperométrica.

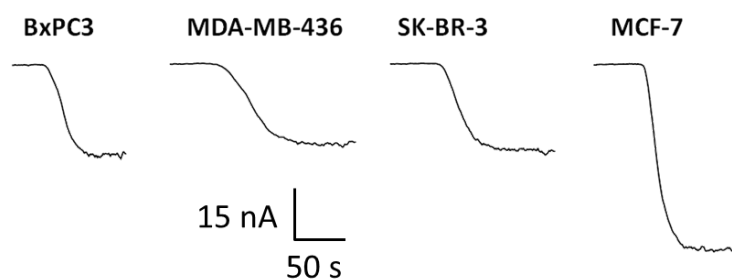
Con objeto de evaluar la **especificidad** del magnetoinmunosensor, se han realizado diferentes ensayos de reactividad cruzada con otras proteínas humanas no específicas. Para ello se han comparado las respuestas amperométricas proporcionadas por el inmunosensor para disoluciones estándar de 0 y 500 pg/ml de ERα y de cada una de estas proteínas no diana. Los resultados mostrados en la Figura 4.54 demuestran que pese a las elevadas concentraciones ensayadas las proteínas no específicas no representan una interferencia en la determinación de ERα, lo que confirma la elevada selectividad del inmunosensor desarrollado.

Con objeto de demostrar la aplicabilidad del inmunosensor para el análisis de muestras reales se decidió en primer lugar analizar muestras de **suero humano** diluidas al 75 % (en PBS con 1 % de BSA) y suplementadas con concentraciones conocidas de estándares de ER $\alpha$ .

Con objeto de evaluar la existencia de efecto matriz en estas determinaciones se ha construido un calibrado de adiciones estándares con muestras que contienen concentraciones de ER $\alpha$  comprendidas entre 0,0 y 2,0 ng/mL. El ajuste de los resultados obtenidos por mínimos cuadrados proporciona un valor de pendiente de  $0,262 \pm 0,006$  nA mL/pg, valor que no es significativamente diferente del obtenido para la curva de calibración en PBST ( $0,27 \pm 0,01$  nA mL/pg), lo que confirma la ausencia de efecto matriz. Por tanto, para determinar la concentración de ER $\alpha$  en este tipo de muestras, bastaría con interpolar la respuesta amperométrica obtenida para las mismas en la curva de calibración obtenida con disoluciones estándar de ER $\alpha$ . Con objeto de demostrar la utilidad de esta metodología se realizaron ensayos de recuperación para muestras de suero suplementadas con un contenido conocido de estándar ER $\alpha$  (500 y 2000 pg/mL) obteniéndose valores de recuperación del  $95 \pm 11$  % y del  $93 \pm 9$  % respectivamente. Estos resultados confirman nuevamente la elevada selectividad del inmunosensor y su utilidad para el análisis fiable de niveles muy bajos de ER $\alpha$  en suero humano escasamente diluido.

También se ha evaluado la aplicabilidad de este inmunosensor para determinar ER $\alpha$  en lisados celulares, empleando para ello líneas celulares con diferente expresión de este receptor: MDA-MB-436 (ER $\alpha$ -), MCF7 (ER $\alpha$ +) y SKBR3 (ER $\alpha$ -). Complementariamente, también se estudió la expresión de ER $\alpha$  en lisados celulares de la línea celular BxPC3, proveniente de un adenocarcinoma pancreático. Es importante destacar la dificultad de realizar determinaciones en estas matrices tan complejas, donde el receptor proteico a determinar se encuentra en una concentración muy baja con respecto al resto de los componentes celulares.

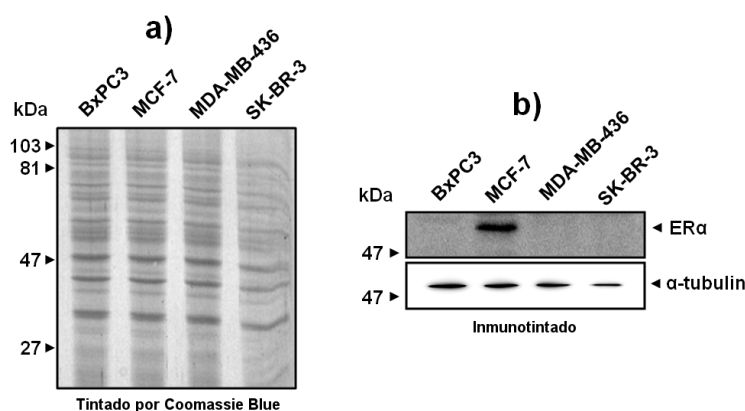
Los resultados de las determinaciones amperométricas realizadas para todos estos lisados celulares se representan en la Figura 4.55. Como puede observarse, los lisados celulares con una baja expresión de ER $\alpha$  (BxPC3, MDA-MB-436 y SKBR3) mostraron una señal amperométrica muy baja, similar a la obtenida en ausencia de ER $\alpha$ . Sin embargo, la respuesta amperométrica obtenida para la línea celular MCF-7, que sobrexprende el receptor ER $\alpha$  (Brooks et al., 1973), es significativamente superior. Es importante destacar la baja cantidad de lisado celular empleada en cada una de estas medidas:  $2,5 \mu$ , cantidad por debajo de la cual no se hizo aparente ningún efecto matriz, permitiendo el cálculo de la concentración de ER $\alpha$  por simple interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en el calibrado de disoluciones estándares. En la Tabla 4.9 se recogen los resultados obtenidos con el inmunosensor desarrollado y empleando el kit ELISA comercial.



**Figura 4.55:** Determinación de ER $\alpha$  en lisados celulares. Las respuestas amperométricas han sido obtenidas con el magnetoinmunosensor para disoluciones que contienen 2,5  $\mu$ g de lisado celular. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag.

Muestra	ELISA	Magnetoinmunosensor
MCF-7	(21 $\pm$ 1) RSD <sub>n=3</sub> =2,0 %	(22 $\pm$ 2) RSD <sub>n=3</sub> =3,6 %
MDA-MB-436	(5 $\pm$ 1) RSD <sub>n=3</sub> =8,4 %	(3,7 $\pm$ 0,8) RSD <sub>n=3</sub> =9,1 %
SK-BR-3	(5,5 $\pm$ 0,8) RSD <sub>n=3</sub> =6,0 %	(5 $\pm$ 1) RSD <sub>n=3</sub> =8,2 %
BxPC3	(2,6 $\pm$ 0,6) RSD <sub>n=3</sub> =9,1 %	(2,3 $\pm$ 0,4) RSD <sub>n=3</sub> =7,5 %

**Tabla 4.9:** Determinación de ER $\alpha$  en lisados de diferentes líneas celulares empleando el magnetoinmunosensor desarrollado y un kit ELISA comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como 3 $\times$ SD (n=3).



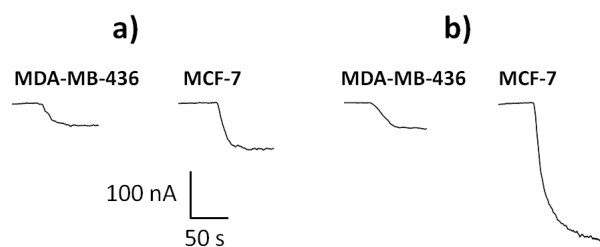
**Figura 4.56:** Caracterización de los lisados celulares obtenidos en función de su nivel de expresión de ER $\alpha$  por medio de Western Blot. Cantidades de 20 y 50  $\mu$ g de lisados de diferentes líneas celulares (BxPC3, MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3) se han analizado de manera independiente por SDS-PAGE 10 % y tintado con Coomassie Blue (a) o transferencia a membranas de nitrocelulosa y capturados con anticuerpos específicos antiER $\alpha$  (b), respectivamente. Se indican las masas moleculares en kD de las proteínas marcadoras empleadas.

La diferente expresión del receptor ER $\alpha$  en los lisados obtenidos también se ha puesto de manifiesto en la caracterización de los mismos mediante la técnica Western Blot (Figura 4.56), obteniéndose resultados que concuerdan con los descritos en la bibliografía (Brooks et al., 1973) y los proporcionados por el magnetoinmunosensor y el kit ELISA.

Es importante mencionar además que la concentración de ER estimada para los lisados de MCF-7 ( $332 \pm 30$  fmol/mg) concuerda con los resultados descritos en otros estudios: 289,5 fmol/mg (Stoica et al., 1997) y 285 fmol/mg (Martin et al., 2004a). Merece la pena resaltar también la elevada sensibilidad del inmunosensor, que permite realizar la determinación empleando solo 2,5  $\mu$ g de lisado, en comparación con los 20–50  $\mu$ g requeridos por otros métodos de detección inmunoquímicos tradicionales, como el Western Blot.

En definitiva, la alta sensibilidad demostrada por el magnetoinmunosensor desarrollado, capaz de cuantificar concentraciones de ER $\alpha$  en el rango de los 35 (células BxPC3) a los 332 fmol/mg (células MCF-7) en lisados celulares, abre la vía de aplicación de este sensor en el diagnóstico de cáncer de mama en relación a la sobreexpresión del biomarcador ER $\alpha$ , cuyo valor normal se encuentra en los 37 fmol/mg y por tanto en el rango de determinación del sensor.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en el análisis de muestras de suero y de lisados celulares, se decidió evaluar también la aplicabilidad del magnetoinmunosensor para la clasificación *in-vitro* de células intactas en función de su nivel de expresión de ER $\alpha$ . Para ello, se han analizado muestras de distintos cultivos celulares, sin lisar, a través de la captura y posterior marca-

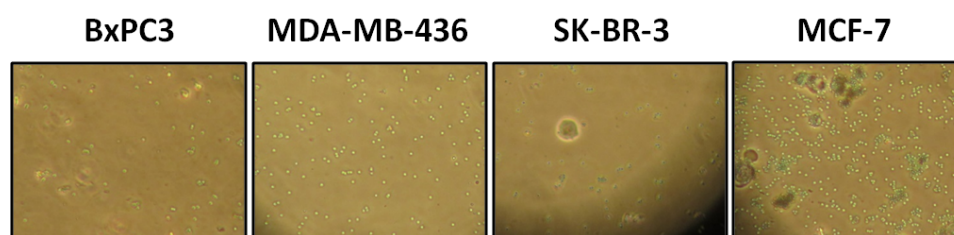


**Figura 4.57:** Respuestas amperométricas proporcionadas por el inmunosensor desarrollado para la determinación de ER $\alpha$  en célula entera. Respuestas amperométricas obtenidas para suspensiones que contienen 12500 (a) y 62500 (b) células.

je enzimático de las células intactas a través del ER $\alpha$  presente en la membrana de las mismas. Siguiendo una metodología similar a la expuesta en la Sección 4.2.2.1, se ha obtenido una respuesta amperométrica significativamente mayor para las células MCF-7 en comparación con las células SK-BR-3 y MDA-MB-436, que producen una respuesta muy discreta y las células de control BxCP3 que no proporcionan una respuesta significativamente diferente que la que se obtiene en ausencia de ER.

En la Figura 4.57 se comparan las respuestas amperométricas obtenidas para suspensiones con diferente contenido celular de células MCF-7 y MDA-MB-436. Por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas al analizar el nivel de expresión de ER $\alpha$  en estas células intactas en la curva de calibración construida para estándares, se ha podido estimar el número de receptores ER $\alpha$  en las células MCF-7. Se ha calculado una cantidad total de  $0,27 \pm 0,06$  fg de ER $\alpha$  por célula, lo que equivale a  $2451 \pm 548$  receptores por célula, valores totalmente consistentes con los descritos por otros autores de  $2551 \pm 164$  (Pawlak y Wiebe, 2007).

Para demostrar de forma inequívoca la validez de la metodología propuesta para la captura específica de las células a través del receptor ER $\alpha$ , se incubaron antiER $\alpha$ -MBs con diferentes suspensiones celulares y se analizaron los complejos obtenidos al microscopio. Las **micrografías** obtenidas (ver Figura 4.58) muestran cómo las HOOC-MBs funcionalizadas con antiER $\alpha$  no capturan células del tipo MDA-MB-436 ni BxCP3 y una muy reducida cantidad de células SK-BR-3, pero por el contrario atrapan multitud de células de la línea MCF-7, que sobreexpresa ER $\alpha$ . Estos resultados concuerdan a la perfección con los obtenidos con el inmunosensor amperométrico.



**Figura 4.58:** Fotografías obtenidas al incubar antiER $\alpha$ -MBs con diferentes suspensiones celulares, observándose los complejos célula-MBs que se forman en los tipos celulares que sobreexpresan receptores ER $\alpha$  en su superficie.

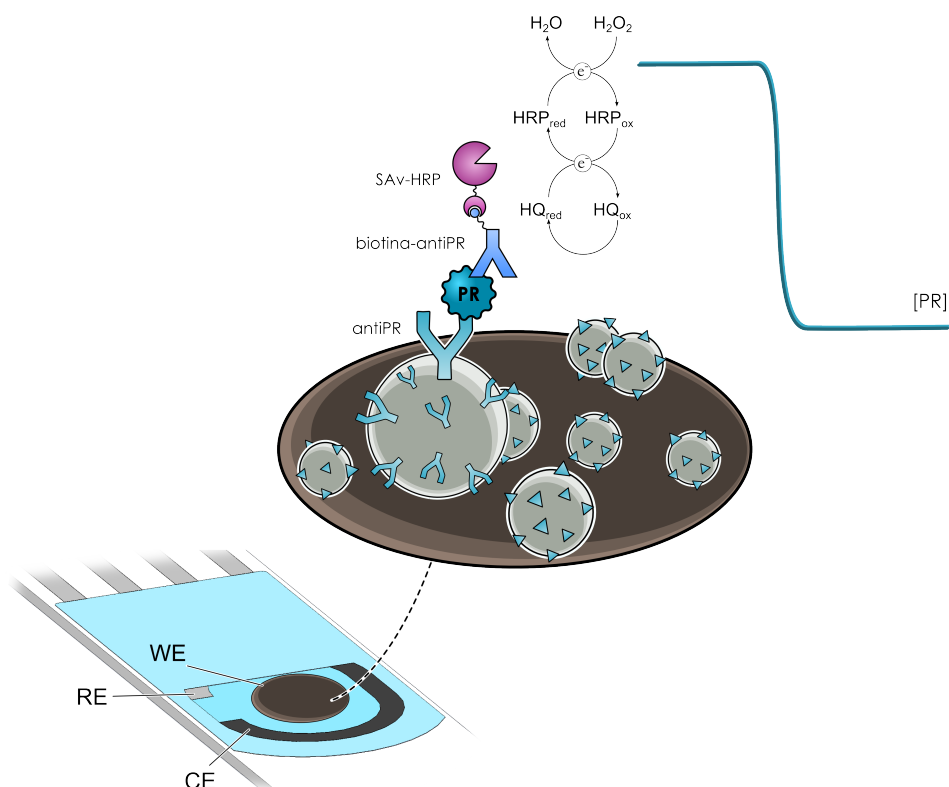
En comparación con la única referencia de detección electroquímica de ER $\alpha$  encontrada (Zhu et al., 2013a), el sensor desarrollado en este trabajo ofrece ventajas muy significativas, entre las que cabe destacar la mayor sensibilidad obtenida (19 pg/mL *vs* 25100 pg/mL) y la reducción drástica del tiempo de ensayo (5 h *vs* 19 h). Ambas características resultan de gran interés en el ámbito clínico, en el que tendrá gran acogida una técnica sensible de manejo sencillo, rápida respuesta y capaz de realizar determinaciones fiables empleando cantidades reducidas de muestra.

El magnetoinmunosensor también presenta importantes ventajas desde el punto de vista práctico en comparación con la metodología clásica empleada, el kit ELISA comercial. El inmunosensor desarrollado proporciona una sensibilidad similar pero en un menor tiempo de ensayo y con una instrumentación menos costosa y apta para realizar determinaciones *in situ* por su fácil miniaturización. Por otro lado, el hecho de estar basada en electrodos desechables, el requerir una pequeña cantidad de muestra y la capacidad de miniaturizar y automatizar todo el proceso en un instrumento compacto y de bajo coste hacen que la metodología desarrollada pueda servir como base para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico tipo POC que puedan introducirse de manera sencilla en la rutina hospitalaria. Cabe destacar también el gran avance que supone el magnetoinmunosensor desarrollado para el análisis directo de células intactas, evitando los procesos de fijado y permeabilización de las células requeridos en el número limitado de kits ELISA disponibles comercialmente para la determinación del receptor diana en células enteras.

## PR

Además del ER $\alpha$ , el PR tiene un papel muy importante dentro de la familia de los receptores hormonales en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama. Junto con otros factores de transcripción, participa en la regulación del crecimiento y desarrollo celular y su sobreexpresión en células cancerosas está directamente relacionada con la evolución de la enfermedad. Especialmen-



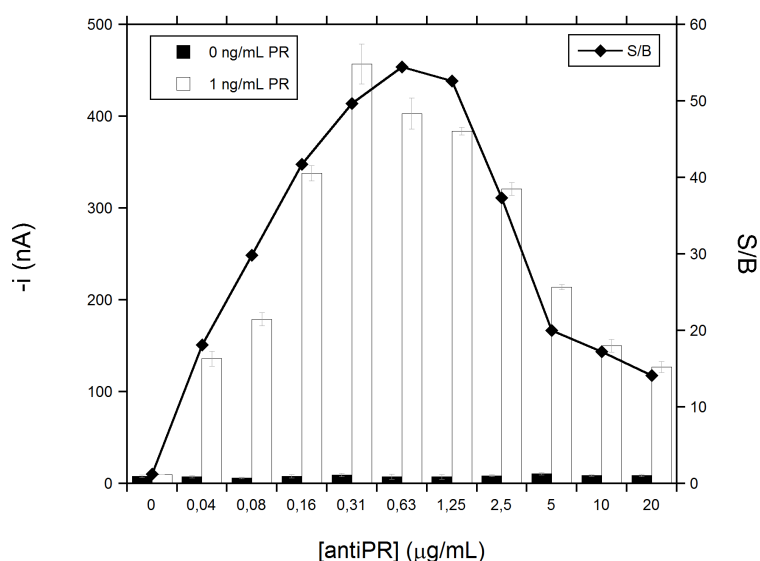


**Figura 4.59:** Representación esquemática del proceso de determinación de PR por medio del magnetoinmunsensor desarrollado. Sobre las HOOC-MBs funcionalizadas específicamente con antiPR, se forma el inmunocomplejo tipo sándwich tras la captura y marcaje enzimático del receptor hormonal. Posteriormente, estos inmunoconjugados magnéticos se capturan sobre el WE con ayuda de un imán de neodimio y se realiza la determinación amperométrica por medio del sistema redox HRP/HQ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

te en pacientes con cáncer de mama, la respuesta a un tratamiento endocrino está directamente ligado al nivel de expresión de receptores hormonales como el ER $\alpha$  o el PR. Por esta razón, y con el objetivo de completar la tríada de biomarcadores relacionados con el cáncer de mama, se ha desarrollado también un magnetoinmunsensor amperométrico para la determinación de este receptor hormonal.

En la Figura 4.59 se muestra un esquema de la metodología empleada para la determinación de PR. El formato en ensayo, similar al empleado para la determinación de ER $\alpha$ , está basado en una configuración tipo sándwich sobre HOOC-MBs y en detección amperométrica sobre electrodos desechables de carbono empleando el sistema HRP/HQ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

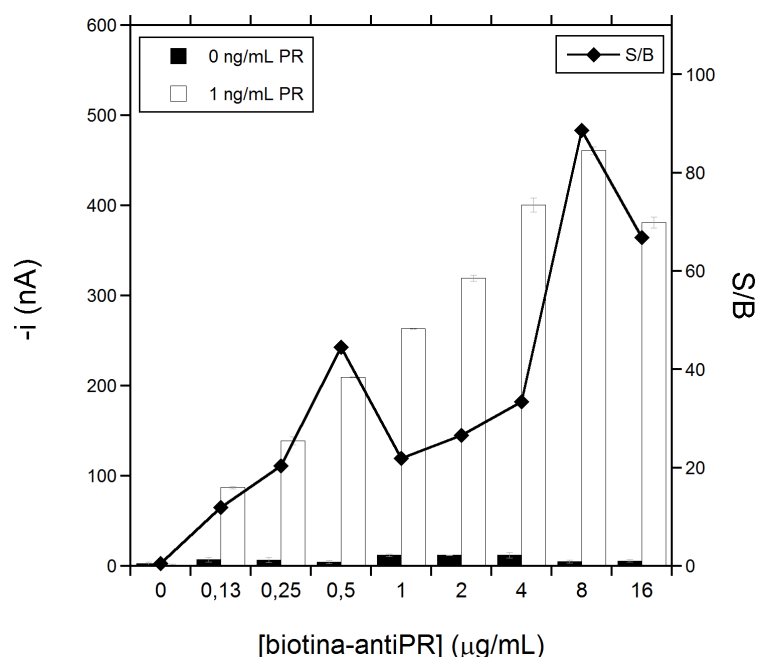
En este caso, la optimización de las variables experimentales se ha realizado por comparación de las respuestas amperométricas obtenidas para están-



**Figura 4.60:** Efecto de la concentración de antiPR en las respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetoinmunosensor desarrollado para estándares de 0 y 1 ng/mL de PR. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

dares de PR de 0 y 1 ng/mL. En primer lugar, se ha seleccionado la **concentración óptima de anticuerpo de captura** (antiPR) empleado en el proceso de funcionalización de las HOOC-MBs. En la Figura 4.60 se muestra el amplio rango de concentraciones testado, desde los 0  $\mu\text{g/mL}$  hasta los 20  $\mu\text{g/mL}$ . Como puede observarse, aunque las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de analito son muy pequeñas y no varían en todo el espectro de concentraciones de anticuerpo de captura ensayados, las respuestas obtenidas para estándares de 1 ng/mL de PR aumentan con la concentración de antiPR hasta un valor de 310 ng/mL de antiPR y disminuyen para concentraciones superiores debido a la pérdida de eficiencia en el inmunoreconocimiento descrita cuando se tiene una cantidad excesiva de anticuerpo inmovilizada en la superficie (Alves et al., 2015). Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó una concentración de 310 ng/mL de antiPR para el desarrollo del magnetoinmunosensor.

El efecto de la **concentración del anticuerpo de detección** se evaluó en el intervalo comprendido entre 0 y 16  $\mu\text{g/mL}$ . Como demuestran los resultados de la Figura 4.61, aunque no hay una variación significativa para las respuestas obtenidas en ausencia de antígeno, las respuestas obtenidas en presencia del mismo aumentan linealmente con la concentración del anticuerpo de detección hasta un valor de 8  $\mu\text{g/mL}$  y disminuyen para valores superiores. En vista de estos resultados y puesto que la sensibilidad es suficiente con el fin de reducir el coste por ensayo se seleccionó una concentración de anticuerpo de de-



**Figura 4.61:** Efecto de la concentración del anticuerpo de detección en las respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetoinmunsensor desarrollado para estándares de 0 y 1 ng/mL de PR. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

tección de  $2 \mu\text{g/mL}$  para estudios posteriores. Cabe destacar sin embargo, que en aplicaciones concretas en las que la concentración de PR en la muestra sea extraordinariamente baja, se puede mejorar significativamente la sensibilidad del magnetoinmunsensor aumentando la concentración de este anticuerpo de detección.

Siempre buscando la aplicabilidad práctica del inmunsensor desarrollado y puesto que junto con el coste por ensayo, otro de los factores más importantes es el tiempo de ensayo se evaluó la influencia del tiempo de incubación de las antiPR-MBs con las disoluciones estándar de PR estudiándose periodos de tiempo comprendidos entre los 30 min y las 18 h. Los resultados obtenidos (no mostrados) demostraron que pese a que la sensibilidad del magnetoinmunsensor aumenta ligeramente con el tiempo de incubación, y puesto que la sensibilidad ya es suficiente para la aplicación práctica perseguida, esta mejora no compensa alargar el tiempo de ensayo, por lo que se decidió continuar trabajando con un tiempo de incubación de 60 min.

Al mismo tiempo, y con una finalidad similar, se estudió la posibilidad de combinar las diferentes etapas de la formación del inmunocomplejo en una sola. Para ello se han comparado las respuestas amperométricas obtenidas pa-

Variable experimental	Rango evaluado	Valor seleccionado
[antiPR], ng/mL	39–20000	313
[biotina–antiPR], ng/mL	125–16000	2000
nº pasos	1–3	3
t <sub>Incubación</sub> , h	0,5–18	60

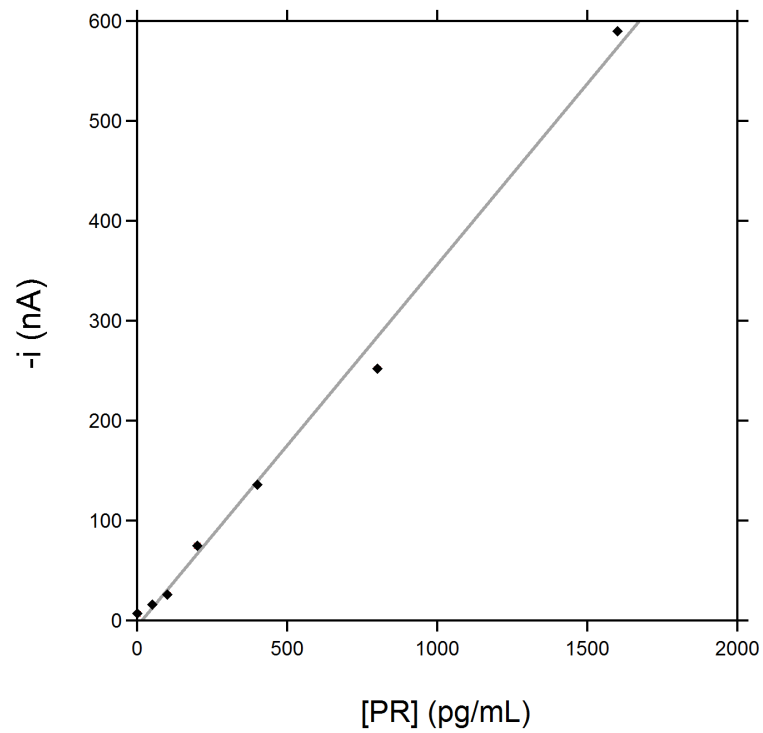
**Tabla 4.10:** Variables experimentales optimizadas para el desarrollo del magnetoinmunosensor de PR.

ra estándares de PR de 0 y 1 ng/mL tras incubar las antiPR–MBs en una disolución mezcla que contiene el estándar de PR, el anticuerpo de detección biotinilado y la SAV–HRP. En estas condiciones no se obtuvo ninguna diferencia entre las respuestas obtenidas en ausencia y en presencia PR. Cabe destacar que estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el desarrollo del magnetoinmunosensor de ER $\alpha$  y atribuidos al marcaje rápido del anticuerpo de detección con la SAV–HRP, que dificulta el reconocimiento del antígeno. Teniendo en cuenta estos resultados, se ha optado por basar la detección de PR en un protocolo de tres pasos de incubaciones secuenciales. A modo de resumen se recogen en la Tabla 4.10 los rangos estudiados y los valores seleccionados para cada una de las variables optimizadas.

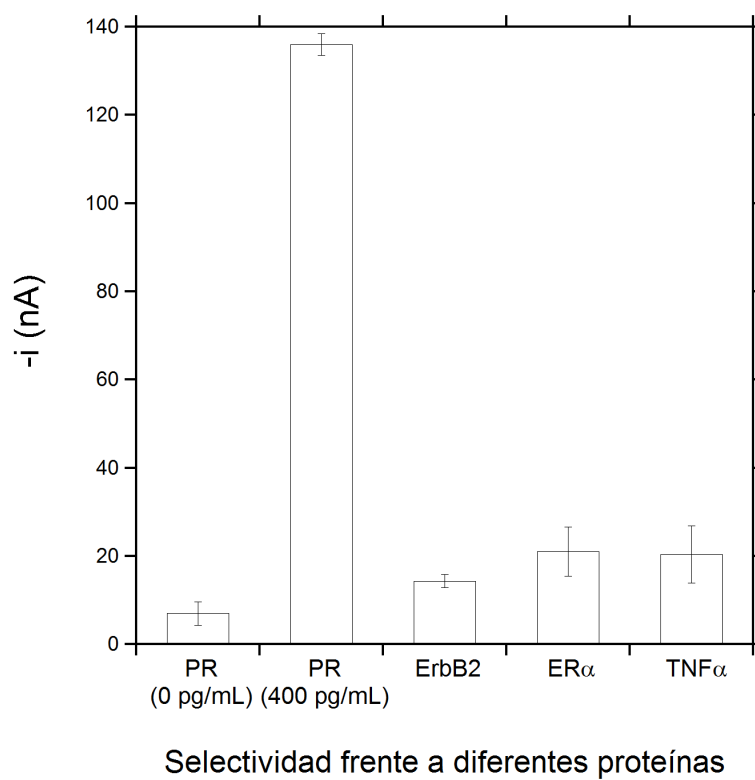
En las condiciones experimentales optimizadas, se ha obtenido una **curva de calibrado** para estándares de PR (preparados en PBST) que muestra una dependencia lineal ( $r=0,997$ ) entre el valor de la corriente catódica y la concentración de PR en el intervalo comprendido entre 73 pg/mL y 1500 pg/mL PR (ver Figura 4.62). El ajuste por mínimos cuadrados proporciona una pendiente de  $0,36 \pm 0,01$  nA·mL/pg y una ordenada en el origen de  $-5 \pm 8$  nA. Siguiendo la metodología expuesta en la Sección 3.4.2.1, los valores estimados para el LD y de LQ resultaron de 22 y 73 pg/mL, respectivamente.

El valor de RSD estimado, de 1,1 %, a partir de las medidas amperométricas proporcionadas por 5 magnetoinmunosensores diferentes preparados de la misma manera para una disolución estándar de PR de 1 ng/mL, confirma la robustez de los protocolos empleados en la fabricación del magnetoinmunosensor y en la transducción amperométrica.

También se ha estudiado la **selectividad** del sensor frente a otras proteínas no específicas, como ErbB2, ER $\alpha$  y TNF $\alpha$ . Para ello, se han analizado muestras positivas (contenido de 400 pg/mL de PR) y de referencia (contenido de 0 pg/mL de PR) junto con otras muestras, cada una de ellas a una concentración de 10 ng/mL de las proteínas no específicas antes mencionadas. Los resultados, reflejados en la Figura 4.63 indican la elevada selectividad del sensor; mientras que la muestra con PR ofrece la señal amperométrica esperada, el resto de muestras, en ausencia de PR, dan como resultado señales muy similares a la del control negativo, demostrando la alta selectividad del sensor propuesto.



**Figura 4.62:** Curva de calibración obtenida con el magnetoinmunsensor desarrollado para disoluciones estándar de PR preparadas en PBST pH 7,5 con un 1 % de BSA. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V *vs* electrodo de pseudo-referencia de Ag. Barras de error (no visibles por el tamaño del punto) estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

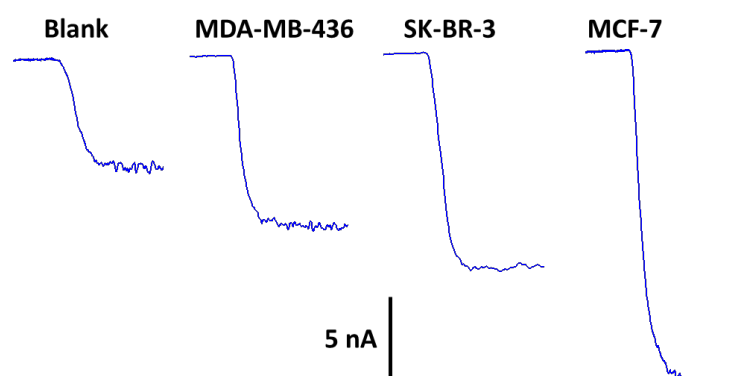


**Figura 4.63:** Respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetoinmunosensor para disoluciones estándar de 0 y 400 pg/ml de PR y 10 ng/mL de ErbB2, ER $\alpha$  y TNF $\alpha$ . Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como  $3 \times SD$  ( $n=3$ ).

A lo largo de este trabajo se ha venido destacando tanto la dificultad como el interés de poder realizar las medidas en **muestras reales**, teniendo en cuenta la aplicabilidad del sensor en un entorno de análisis clínico. Estas muestras pueden ser, por un lado biopsias líquidas (suero en este caso) o muestras de origen tisular/celular (células, tanto lisadas como íntegras), por lo que se ha evaluado la aplicabilidad del magnetoinmunosensor desarrollado para el análisis de ambos tipos de muestras.

Para las determinaciones en suero se han empleado muestras de **suero humano** diluidas al 75 % (en PBST suplementado con 1 % de BSA). Se ha demostrado la ausencia de efecto matriz en suero construyendo una curva de calibración en este tipo de muestras suplementadas con concentraciones crecientes de estándares de PR (hasta 1500 pg/mL) y comparando estadísticamente el valor de la pendiente que resulta en este caso ( $0,32 \pm 0,02$  nA mL/pg) con el obtenido para disoluciones estándares ( $0,36 \pm 0,01$  nA mL/pg). Por tanto, el contenido endógeno de PR en una muestra de suero podría obtenerse directamente por interpolación de la respuesta amperométrica obtenida para la muestra diluida al 75 % en la curva de calibrado obtenida para estándares de PR. De acuerdo con esta metodología, se han estimado valores de recuperación del 94,7 % (RSD=1,9 %) y del 100,3 % (RSD=3,6 %) para dos muestras de suero humano suplementadas con 400 y 1600 pg/mL, respectivamente, de un estándar de PR. Todos estos resultados demuestran claramente la fiabilidad del magnetoinmunosensor para determinar la concentración de PR en muestras de suero humano después de una mínima dilución de las mismas.

También se ha estudiado la aplicabilidad del sensor para el análisis de **lisados celulares**. Para ello, se han empleado líneas celulares de cáncer de mama con diferentes niveles de expresión del receptor diana: MCF-7 (PR+), SK-BR-3 (PR-) y MDA-MB-436 (PR-). Como puede observarse en la Figura 4.64, la línea celular que sobreexpresa el receptor objetivo (MCF-7) es la que mayor respuesta amperométrica proporciona, la única que sobreexpresa PR. Estas determinaciones concuerdan con la caracterización de los lisados preparados por SDS-PAGE (Figura 4.65) y con resultados descritos en la literatura (Rondón-Lagos et al., 2014). Puesto que tampoco se observó efecto matriz en la determinación de este receptor cuando se analizaban cantidades de lisado iguales o inferiores a  $2,5 \mu\text{g}$ , se determinó el contenido endógeno de PR en los mismos por interpolación en el calibrado obtenido para estándares (Figura 4.62), obteniéndose los resultados que se recogen en la Tabla 4.11. En la misma Tabla se muestran los resultados que se obtienen al analizar los mismos lisados empleando un kit ELISA espectrofotométrico comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos. La comparación estadística demuestra que no hay diferencias significativas (a un nivel de significación de 0,05) entre los resultados proporcionados por ambas metodologías. Conviene destacar también que la concentración de PR estimada para la línea celular MCF-7 ( $128 \pm 18$  fmol/mg) coincide con los resultados descritos por otros autores:  $111 \pm 16$  fmol/mg (Brandes



**Figura 4.64:** Determinación de PR en lisados celulares. Las respuestas amperométricas han sido obtenidas con el magnetosensor para muestras en ausencia y en presencia de  $2,5 \mu\text{g}$  de lisado celular. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20 \text{ V}$  vs electrodo de pseudoreferencia de Ag.

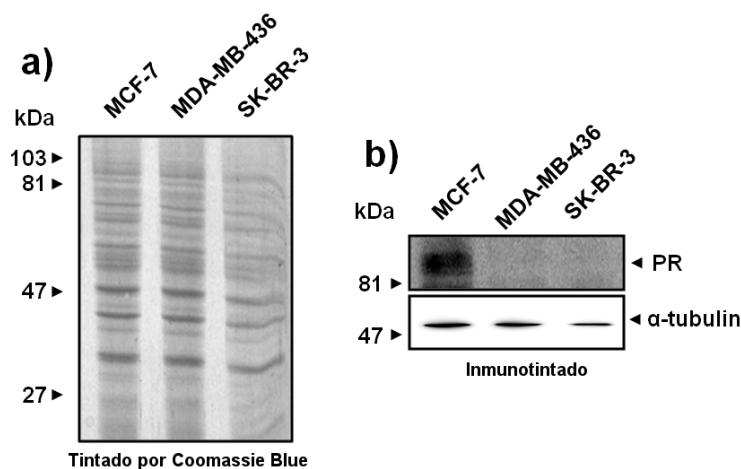
Muestra	ELISA	Magnetosensor
MCF-7	$(15 \pm 3) \text{ RSD}_{n=3} = 3,2 \%$	$(15 \pm 2) \text{ RSD}_{n=3} = 2,1 \%$
MDA-MB-436	$(4,3 \pm 0,6) \text{ RSD}_{n=3} = 0,6 \%$	$(3,9 \pm 0,7) \text{ RSD}_{n=3} = 0,7 \%$
SK-BR-3	$(6 \pm 1) \text{ RSD}_{n=3} = 1,4 \%$	$(7,2 \pm 0,8) \text{ RSD}_{n=3} = 0,8 \%$

**Tabla 4.11:** Resultados obtenidos en la determinación de PR (en  $\text{pg}/\mu\text{g}$ ) en lisados celulares provenientes de diferentes líneas celulares por medio del magnetosensor desarrollado en este trabajo y un ELISA comercial basado en el empleo de los mismos inmunoreactivos. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{\text{app}} = -0,20 \text{ V}$  vs electrodo de pseudoreferencia de Ag.

y Hermonat, 1983),  $47,1 - 114,0 \text{ fmol/mg}$  (Konecny et al., 2003) y  $115,0 \text{ fmol/mg}$  (Un et al., 2012), lo que respalda la fiabilidad del magnetosensor desarrollado también para la determinación en este tipo de muestras.

Es importante apuntar que la línea celular MCF-7, empleada en este trabajo como control positivo, muestra un nivel medio de expresión de PR en comparación con otras líneas celulares de cáncer de mama como la T47D, la cual presenta una expresión de PR a nivel de mRNA unas 20 veces superior (Adomas et al., 2014; Sivik y Jansson, 2012). Por tanto, el que el inmunosensor propuesto sea capaz de diferenciar células con un nivel intermedio de expresión de PR indica el potencial de la técnica. Conviene destacar también la mínima cantidad de muestra requerida para la detección, unos  $2,5 \mu\text{g}$  de lisado, en comparación con los  $20-50 \mu\text{g}$  requeridos por métodos inmunoquímicos tradicionales como el Western Blot. Además, la sensibilidad del sensor podría aumentarse para su aplicación en casos de diagnóstico precoz que requieran de una detección extremadamente sensible, además de aumentando la concentración de anticuerpo de detección, empleando diferentes estrategias de amplificación



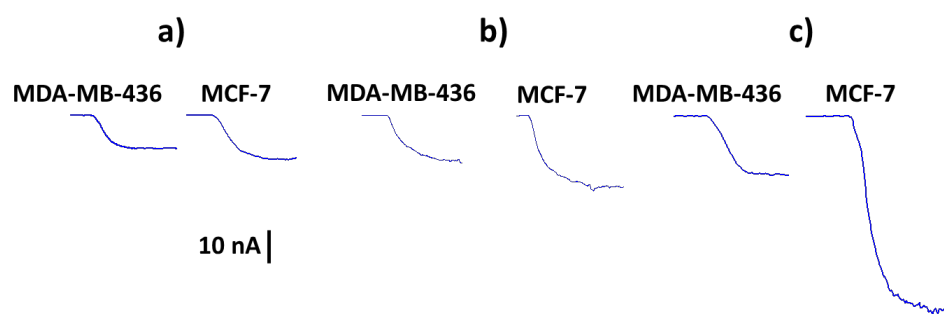


**Figura 4.65:** Caracterización de los diferentes lisados celulares en función de su nivel de expresión de PR por medio de Western Blot. Se han empleado 20  $\mu$ g y 50  $\mu$ g de lisado de las diferentes líneas celulares (MCF-7, MDA-MB-436 y SK-BR-3) de manera independiente por SDS-PAGE 10% y tintado con Coomassie Blue (a) o transferencia a membranas de nitrocelulosa y marcaje con anticuerpos específicos antiPR (b). Se indican las masas moleculares de las proteínas marcadoras empleadas como estándares en kD.

basadas en el uso de dendrímeros de ADN marcados comerciales (Wei et al., 2009) o nanomateriales bioconjugados (Wang et al., 2014).

Como en los casos de ErbB2 y ER $\alpha$ , también se ha evaluado la posibilidad de determinar el nivel de expresión de PR directamente sobre las **células íntegras** sin lisis previa. Para ello se ha aplicado el magnetoinmunosensor desarrollado al análisis de suspensiones de dos líneas celulares diferentes, una con un nivel de expresión bajo de PR (MDA-MB-436) y otra con un nivel intermedio (MCF-7) a tres densidades distintas (12500, 62500 y 1125000 células/medida). Los resultados, representados en la Figura 4.66, muestran una diferencia clara entre las respuestas amperométricas obtenidas con ambas líneas celulares (consistente con la diferente expresión de PR en ellas) que se hace más significativa con la densidad celular ensayada.

Se ha completado el estudio realizando una estimación del número de receptores PR por célula por medio de la interpolación de la señal amperométrica registrada en la curva de calibración de estándares (Figura 4.62). El valor obtenido de 275 ng de PR por cada  $10^7$  células MCF-7, está de acuerdo con los resultados de aplicabilidad a la determinación en esta línea celular descritos en las especificaciones del kit ELISA comercial. Todos estos resultados demuestran que el sensor desarrollado en este trabajo se puede emplear satisfactoriamente para la discriminación en función de su nivel de expresión de



**Figura 4.66:** Evaluación del nivel de expresión de PR en células MDA-MB-436 y MCF-7 empleando el magnetoinmunosensor desarrollado en este trabajo. Respuestas amperométricas obtenidas para suspensiones de células que contienen 12500 (a), 62500 (b) y 125000 (c) células cancerosas. Electrolito de medida: PB pH 6,0.  $E_{app} = -0,20$  V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag.

PR directamente de células enteras, sin necesidad de ningún pretratamiento previo.

#### 4.2.2.2. Multideterminación de biomarcadores

Hasta ahora, se ha evaluado el rendimiento de magnetoinmunosensores para la determinación individual de biomarcadores proteicos. En este contexto, hoy en día está claro además que son necesarias colecciones o paneles de biomarcadores tumorales, en contraposición a la medida de un marcador individual, para un diagnóstico y pronóstico fiables de la enfermedad. Así, se ha demostrado que la detección de cinco o más biomarcadores para un determinado tipo de cáncer dado, ha proporcionado diagnósticos fiables en más del 99% de los casos. El aumento de la capacidad predictiva es tanto una cuestión estadística como bioquímica. Así, un biomarcador individual para un tipo de cáncer dado puede, por algún motivo bioquímico, estar muy poco expresado en un paciente determinado, pero sería muy improbable que un panel de proteínas biomarcadoras indicadoras de ese cáncer no se expresaran adecuadamente. Además, monitorizando un biomarcador individual pueden aparecer bastante frecuentemente falsos positivos y negativos; falsos diagnósticos que, por otro lado, se minimizan significativamente trabajando con un panel de biomarcadores. Otro aspecto a considerar es que los biomarcadores de cáncer individuales no son a menudo específicos para un tipo de cáncer, pero sí parece ser factible definir colecciones de biomarcadores cuyos niveles individuales elevados tomados en conjunto sean predictores fidedignos de cánceres específicos. Por lo tanto, un reto particularmente importante hoy en día es el desarrollo de dispositivos bioanalíticos para medir múltiples biomarcadores de cáncer.

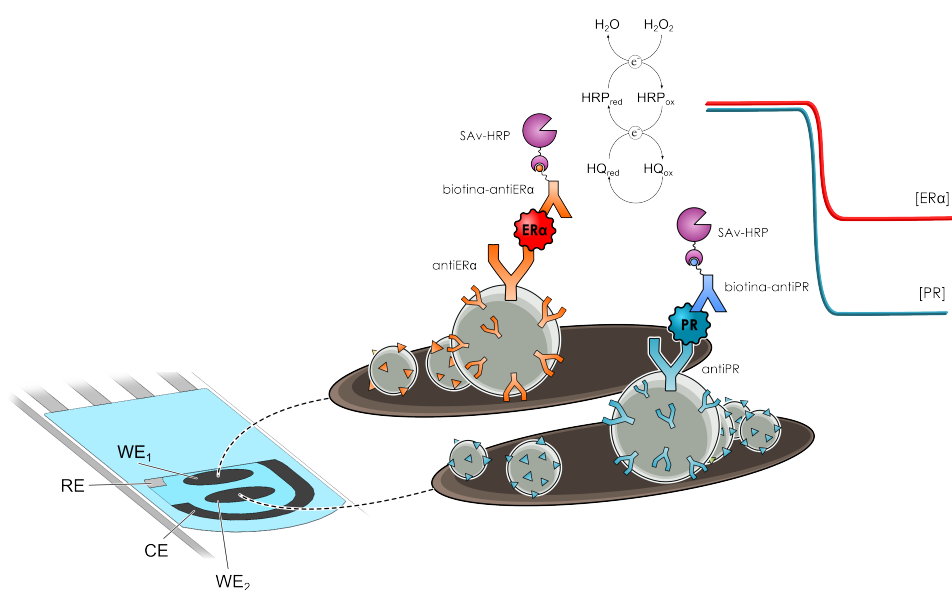
En el caso concreto del cáncer de mama, tal y como se ha comentado anteriormente, hay varias biomoléculas con un importante valor predictivo. Las más aceptadas actualmente son el ErbB2, el ER $\alpha$  y el PR, cuya determinación individual en diferentes tipos de muestras se ha abordado con éxito a lo largo de esta Tesis doctoral. En la Sección 2.1.2.3, sin embargo, se apuntaba el interés que tiene la detección no solo de uno, sino de los tres biomarcadores simultáneamente. Actualmente, en la práctica clínica se lleva a cabo la determinación de cada uno de ellos por separado. Desde el punto de vista práctico, sin embargo, el desarrollo de un solo test unificado simplificaría mucho el proceso, así como su implementación en la rutina hospitalaria y en escenarios más cercanos al paciente.

Con objeto de demostrar las capacidades de multiplexado de las metodologías desarrolladas y dada la estrecha relación descrita entre el nivel de expresión de ER $\alpha$  y PR (Mohammed et al., 2015) se ha puesto a punto una plataforma inmunosensora dual para estos dos receptores hormonales simultáneamente en un único ensayo.

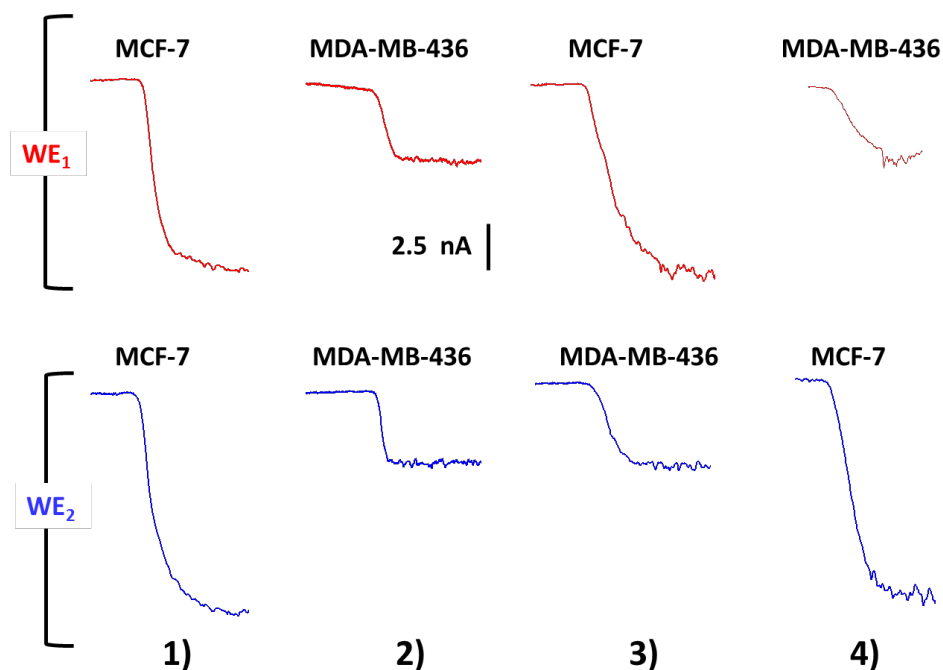
El esquema empleado, ilustrado en la Figura 4.67, se basa en el uso de dos lotes diferentes de HOOC-MBs funcionalizadas específicamente con los anticuerpos de captura específicos para cada uno de los receptores hormonales, sobre las que se forman los inmunocomplejos tipo sándwich de cada uno de los biomarcadores. Los bioconjugados resultantes se capturan magnéticamente sobre cada uno de los dos WE de los SPCE duales (estos SPdCE cuentan con un ER $\alpha$  común, un CE común y dos WE, uno para la determinación de cada uno de los biomarcadores). La detección amperométrica dual se ha llevado a cabo de la manera habitual aplicando un potencial de  $-0,20$  V (*vs* electrodo de pseudoreferencia de Ag) y registrando la corriente catalítica producida en los dos WEs con el sistema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HQ/HRP.

Esta configuración se aplicó a la determinación de la concentración endógena de ER $\alpha$  y PR en dos líneas celulares de cáncer de mama metastático con diferente nivel de expresión de ambos receptores: MCF-7 (PR+ / ER $\alpha$ +) y MDA-MB-436 (PR- / ER $\alpha$ -). Las respuestas amperométricas obtenidas se muestran en la Figura 4.68 y son consistentes claramente con la sobreexpresión de ambos receptores en la línea celular MCF-7, confirmando la viabilidad de la inmunoplateforma para realizar la determinación amperométrica simultánea de ambos biomarcadores en muestras de lisados celulares.

Los resultados mostrados en la Figura 4.68, alternando los diferentes lisados celulares en ambos electrodos de trabajo, también confirman la ausencia de reactividad cruzada entre los WEs adyacentes y la buena selectividad de los inmunoreactivos seleccionados para la determinación de cada uno de los receptores hormonales.



**Figura 4.67:** Representación esquemática de la plataforma desarrollada para la determinación simultánea de ER $\alpha$  y PR. Las HOOC-MBs funcionalizadas con los anticuerpos específicos capturan de manera selectiva el analito (ER $\alpha$  y PR) y estos se marcan enzimáticamente en etapas sucesivas con los correspondientes anticuerpos de detección biotinilados y el conjugado enzimático de SAV-HRP para su cuantificación. Cada lote de bioconjugados se captura sobre uno de los WE de SPdCE y se realiza la detección amperométrica dual con el sistema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HQ/HRP.



**Figura 4.68:** Respuestas amperométricas registradas simultáneamente por medio de la plataforma inmunosensora dual para la determinación de los niveles de expresión de ER $\alpha$  y PR en 2,5  $\mu$ g de lisados celulares de dos líneas celulares diferentes:

- 1) HOOC-MBs-antiER $\alpha$  ( $WE_1$ ) y HOOC-MBs-antiPR ( $WE_2$ ) incubadas en lisados MCF-7.
- 2) HOOC-MBs-antiER $\alpha$  ( $WE_1$ ) y HOOC-MBs-antiPR ( $WE_2$ ) incubadas en lisados MDA-MB-436.
- 3) HOOC-MBs-antiER $\alpha$  ( $WE_1$ ) incubadas en lisados MCF-7 y HOOC-MBs-antiPR ( $WE_2$ ) incubadas en lisados MDA-MB-436.
- 4) HOOC-MBs-antiER $\alpha$  ( $WE_1$ ) incubadas en lisados MDA-MB-436 y HOOC-MBs-antiPR ( $WE_2$ ) incubadas en lisados MCF-7.

La simplicidad de trasladar las metodologías puestas a punto para determinaciones individuales en formatos de multidetección y el buen funcionamiento de la plataforma dual desarrollada confirman la idoneidad de los formatos desarrollados para la implementación futura de plataformas apropiadas para la multideterminación de paneles con mayor número de biomarcadores, lo que resulta esencial, como se ha comentado, para mejorar la fiabilidad en el diagnóstico y el pronóstico de cáncer.



## Capítulo 5

# Conclusiones

En la actualidad está ampliamente aceptado que el diagnóstico temprano y fiable de cáncer es un factor clave en la supervivencia y calidad de vida del paciente. Esta enfermedad es responsable de más de 8 millones de muertes al año en todo el mundo y la segunda causa de muerte por detrás de las enfermedades cardiovasculares. Aunque en los últimos años se han logrado avances importantísimos en la prevención y el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, la incidencia y prevalencia de esta enfermedad está aumentando en todo el mundo debido al continuo crecimiento y envejecimiento de la población mundial y al mantenimiento o aumento del tabaquismo, la obesidad y los patrones dietéticos de riesgo. Teniendo en cuenta estos antecedentes, la implementación de programas no invasivos de detección basados en el empleo de dispositivos eficientes, sencillos y desechables con tiempos de respuesta cortos, de bajo coste y adecuados para realizar determinaciones descentralizadas y fiables de biomarcadores de cáncer ha aumentado considerablemente durante los últimos años.

Dentro de este contexto, las plataformas electroanalíticas, capaces de detectar biomarcadores específicos, están emergiendo rápidamente como importantes herramientas clínicas para mejorar el diagnóstico y pronóstico de pacientes oncológicos con los beneficios que ello conlleva en su calidad de vida y en los costes que supone su tratamiento para el sistema sanitario. Sin embargo, su implementación requiere hacer frente a una serie de retos bioanalíticos importantes en términos de selectividad y sensibilidad, capacidad de multiplexado y posibilidad de automatización. Respondiendo a esta importante demanda de la sociedad en esta Tesis Doctoral se han **desarrollado novedosas plataformas inmunosensoras electroquímicas para la determinación individual o simultánea de biomarcadores proteicos de gran relevancia en cancer (TNF $\alpha$ , ErbB2, ER $\alpha$  y PR) basadas en el empleo de formatos de inmunoensayo tipo sándwich empleando sensores integrados o acoplamientos eficientes de partículas magnéticas con transductores electroquímicos desechables.**



Entre las aportaciones más importantes de las investigaciones realizadas en el marco de esta Tesis doctoral destacan:

- La optimización de una disolución que minimiza el efecto matriz en muestras de elevada complejidad como el suero humano.
- La simplificación de un protocolo de inmunoensayo electroquímico a través del acoplamiento de un inmunosensor integrado en un pequeño circuito microfluídico.
- El desarrollo de las primeras plataformas inmunosensoras descritas hasta fecha para la determinación de los receptores hormonales ER $\alpha$  y PR.
- La posibilidad de discriminar células cancerosas en función del nivel de expresión de sus receptores hormonales empleando células intactas, lo que resulta especialmente relevante para desarrollar metodologías análogas que permitan la caracterización molecular de biomarcadores circulantes de relevancia reciente en cáncer como las células tumorales circulantes y los exosomas.
- La posibilidad de implementar de manera extremadamente sencilla los diseños individuales desarrollados en plataformas de inmunosensado múltiple que permitan la determinación fiable de paneles de biomarcadores seleccionados a la carta para aplicaciones particulares.

Las metodologías desarrolladas, basadas en el uso y acoplamiento apropiado de inmunoreactivos selectivos, atractivos formatos de bioensayo y micropartículas magnéticas y/o transductores desechables electroquímicos convenientemente funcionalizados, permiten la determinación fiable de los analitos objetivo a niveles clínicamente relevantes en muestras biológicas de elevada complejidad pero de carácter mínimamente invasivo tras pretratamientos mínimos: suero humano, lisados celulares y células cancerígenas intactas, proporcionando resultados en concordancia con los que proporciona la tecnología ELISA convencional pero en menos tiempo, con menor coste y empleando instrumentación fácilmente miniaturizable, compatible con análisis descentralizados. Las excelentes capacidades de las plataformas inmunosensoras desarrolladas en términos de simplicidad de manejo, tiempo de ensayo, sensibilidad, selectividad y capacidad de multiplexado las hacen especialmente atractivas para su implementación en dispositivos fáciles de usar y asequibles para realizar determinaciones de rutina que proporcionen resultados complementarios a los que se emplean en la práctica hospitalaria y faciliten el diagnóstico predictivo, el seguimiento terapéutico y el pronóstico de los pacientes, con los beneficios indiscutibles que esto supone para los pacientes y el sistema sanitario. Cabe destacar además que las metodologías desarrolladas pueden extenderse fácilmente a la determinación de otros biomarcadores de relevancia en cáncer u otras enfermedades graves.

Los resultados de esta Tesis Doctoral proporcionan además un conocimiento único en la exploración de nuevos conceptos de biosensorización, que resultan de gran interés para otros investigadores que trabajen en los campos de la Química Analítica y la Electroquímica.



# Bibliografía

- ADOMAS, A. B., GRIMM, S. A., MALONE, C., TAKAKU, M. y SIMS, J. K. Breast tumor specific mutation in GATA3 affects physiological mechanisms regulating transcription factor turnover. *BMC Cancer*, vol. 14(1), página 278, 2014. ISSN 1471-2407.
- AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, vol. 3(9), páginas 745–756, 2003. ISSN 1474-1733.
- AGUILAR, Z., AKITA, R. W., FINN, R. S., RAMOS, B. L., PEGRAM, M. D., KABBINAVAR, F. F., PIETRAS, R. J., PISACANE, P., SLIWKOWSKI, M. X. y SLAMON, D. J. Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene*, vol. 18(44), páginas 6050–62, 1999. ISSN 0950-9232.
- AL-KHAFAJI, Q. A. M., HARRIS, M., TOMBELLI, S., LASCHI, S., TURNER, A. P. E., MAS-CINI, M. y MARRAZZA, G. An Electrochemical Immunoassay for HER2 Detection. *Electroanalysis*, vol. 24(4), páginas 735–742, 2012. ISSN 10400397.
- ALLAVENA, P., GARLANDA, C., BORRELLO, M. G., SICA, A. y MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Current opinion in genetics & development*, vol. 18(1), páginas 3–10, 2008. ISSN 0959-437X.
- ALVES, R. C., PIMENTEL, F. B., NOUWS, H. P., MARQUES, R. C., GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B. N., OLIVEIRA, M. B. P. y DELERUE-MATOS, C. Detection of Ara h 1 (a major peanut allergen) in food using an electrochemical gold nanoparticle-coated screen-printed immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 64, páginas 19–24, 2015. ISSN 09565663.
- ARMSTRONG, E. J., MORROW, D. A. y SABATINE, M. S. Inflammatory Biomarkers in Acute Coronary Syndromes. *Circulation*, vol. 113(6), 2006.
- AYELA, C., ROQUET, F., VALERA, L., GRANIER, C., NICU, L. y PUGNIÈRE, M. Antibody–antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D: A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22(12), páginas 3113–3119, 2007. ISSN 09565663.

- BAHK, Y.-K., KIM, H.-H., PARK, D.-S., CHANG, S.-C. y GO, J.-S. A New Concept for Efficient Sensitivity Amplification of a QCM Based Immunosensor for TNF- $\alpha$  by Using Modified Magnetic Particles under Applied Magnetic Field. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 32(12), páginas 4215–4220, 2011. ISSN 0253-2964.
- BALLAZ, S. y MULSHINE, J. L. The potential contributions of chronic inflammation to lung carcinogenesis. *Clinical lung cancer*, vol. 5(1), páginas 46–62, 2003. ISSN 1525-7304.
- BARDERAS, R., MENDES, M., TORRES, S., BARTOLOMÉ, R. A., LÓPEZ-LUCENDO, M., VILLAR-VÁZQUEZ, R., PELÁEZ-GARCÍA, A., FUENTE, E., BONILLA, F. y CASAL, J. I. In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 12(6), páginas 1602–20, 2013a. ISSN 1535-9484.
- BARDERAS, R., VILLAR-VÁZQUEZ, R., FERNÁNDEZ-ACEÑERO, M. J., BABEL, I., PELÁEZ-GARCÍA, A., TORRES, S. y CASAL, J. I. Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. *Scientific reports*, vol. 3, página 2938, 2013b. ISSN 20452322.
- BARTLETT, P. N. *Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques and applications*. John Wiley & Sons, 2008. ISBN 9780470843642.
- BETTAZZI, F., ENAYATI, L., SÁNCHEZ, I. C., MOTAGHED, R., MASCINI, M. y PALCHETTI, I. Electrochemical bioassay for the detection of TNF- $\alpha$  using magnetic beads and disposable screen-printed array of electrodes. *Bioanalysis*, vol. 5(1), páginas 11–19, 2012.
- BORRAYO, G., CAREAGA, G., MURO, C. J., AUTREY, A., PÉREZ, P., YÁÑEZ, R., ESPÍNOLA, G. y ARGÜERO, R. Assessment of Right Ventricular Function Using Contrast Echocardiography in Patients with Myocardial Infarction. *Revista Española de Cardiología (English Version)*, vol. 56(02), páginas 175–180, 2014. ISSN 255.
- BRANDES, L. J. y HERMONAT, M. W. Receptor Status and Subsequent Sensitivity of Subclones of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Surviving Exposure to Diethylstilbestrol. *Cancer research*, vol. 43(6), páginas 2831–2835, 1983.
- BRENNER, D. R., SCHERER, D., MUIR, K., SCHILDKRAUT, J., BOFFETTA, P., SPITZ, M. R., LE MARCHAND, L., CHAN, A. T., GOODE, E. L., ULRICH, C. M. y HUNG, R. J. A Review of the Application of Inflammatory Biomarkers in Epidemiologic Cancer Research. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, vol. 23(9), 2014.

- BROOKS, C., SOULE, D. y MUEL, K. I. Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 248(10), páginas 6251–6253, 1973.
- BURKE, S. Regression and calibration. *Statistics and Data Analysis*, vol. 1(Special issue), páginas 13–18, 2001.
- CARNEY, W. P., BERNHARDT, D. y JASANI, B. Circulating HER2 Extracellular Domain: A Specific and Quantitative Biomarker of Prognostic Value in all Breast Cancer Patients? *Biomarkers in cancer*, vol. 5, páginas 31–9, 2013. ISSN 1179-299X.
- CENTI, S., LASCHI, S. y MASCINI, M. Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads. *Talanta*, vol. 73(2), páginas 394–9, 2007. ISSN 1873-3573.
- CERAN, C., COKOL, M., CINGOZ, S., TASAN, I., OZTURK, M. y YAGCI, T. Novel anti-HER2 monoclonal antibodies: synergy and antagonism with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *BMC cancer*, vol. 12(1), página 450, 2012. ISSN 1471-2407.
- CHEN, L., DENG, L., LIU, L. y PENG, Z. Immunomagnetic separation and MS/SPR end-detection combined procedure for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and protein A. *Biosensors & bioelectronics*, vol. 22(7), páginas 1487–92, 2007. ISSN 0956-5663.
- COOPER, M. A. *Label-Free Biosensors: Techniques and Applications*. Cambridge University Press, 2009. ISBN 9780521711517.
- CORMIER, E. M., WOLF, M. F. y JORDAN, V. C. Decrease in estradiol-stimulated progesterone receptor production in MCF-7 cells by epidermal growth factor and possible clinical implication for paracrine-regulated breast cancer growth. *Cancer research*, vol. 49(3), páginas 576–80, 1989. ISSN 0008-5472.
- CORREIA, M., CRAVO, M., MARQUES-VIDAL, P., GRIMBLE, R., DIAS-PEREIRA, A., FAIAS, S. y NOBRE-LEITÃO, C. Serum concentrations of TNF- $\alpha$  as a surrogate marker for malnutrition and worse quality of life in patients with gastric cancer. *Clinical nutrition*, vol. 26(6), páginas 728–35, 2007. ISSN 1532-1983.
- DE CREMOUX, P., TRAN-PERENNOU, C., BROCKDORFF, B. L., BOUDOU, E., BRÜNNER, N., MAGDELÉNAT, H. y LYKKESFELDT, A. E. Validation of real-time RT-PCR for analysis of human breast cancer cell lines resistant or sensitive to treatment with antiestrogens. *Endocrine-related cancer*, vol. 10(3), páginas 409–18, 2003. ISSN 1351-0088.
- DERIN, D., SOYDINÇ, H. O., GÜNEY, N., TAS, F., CAMLICA, H., DURANYILDIZ, D., YASASEVER, V. y TOPUZ, E. Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF- $\alpha$  in nonsmall cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 59(2), páginas 240–5, 2008. ISSN 0169-5002.

- EGGINS, B. R. *Chemical sensors and biosensors*. J. Wiley, 2003. ISBN 9780471899143.
- ELETXIGERRA, U., MARTINEZ-PERDIGUERO, J., MERINO, S., VILLALONGA, R., PINGARRÓN, J. M. y CAMPUZANO, S. Amperometric magnetoimmunoassay for the direct detection of tumor necrosis factor alpha biomarker in human serum. *Analytica chimica acta*, vol. 838, páginas 37–44, 2014. ISSN 1873-4324.
- EMAMI, M., SHAMSIPUR, M., SABER, R. y IRAJIRAD, R. An electrochemical immunosensor for detection of a breast cancer biomarker based on antiHER2-iron oxide nanoparticle bioconjugates. *The Analyst*, vol. 139(11), páginas 2858–66, 2014. ISSN 1364-5528.
- ETZIONI, R., URBAN, N., RAMSEY, S., MCINTOSH, M., SCHWARTZ, S., REID, B., RADICH, J., ANDERSON, G. y HARTWELL, L. The case for early detection. *Nature Reviews Cancer*, vol. 3(4), páginas 243–252, 2003. ISSN 1474-175X.
- FANJUL-BOLADO, P., HERNÁNDEZ-SANTOS, D., LAMAS-ARDISANA, P. J., MARTÍN-PERNÍA, A. y COSTA-GARCÍA, A. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta*, vol. 53(10), páginas 3635–3642, 2008. ISSN 00134686.
- FEGHALI, C. A. y WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, vol. 2, páginas 12–26, 1997. ISSN 1093-9946.
- FELZEN, V., HIEBEL, C., KOZIOLLEK-DRECHSLER, I., REISS IG, S., WOLFRUM, U., KÖGEL, D., BRANDTS, C., BEHL, C. y MORAWE, T. Estrogen receptor  $\alpha$  regulates non-canonical autophagy that provides stress resistance to neuroblastoma and breast cancer cells and involves BAG3 function. *Cell Death and Disease*, vol. 6(7), página e1812, 2015. ISSN 2041-4889.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D., FORMAN, D. y BRAY, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. *GLOBOCAN*, vol. 11, 2012.
- FUQUA, S. A. y CUI, Y. Estrogen and progesterone receptor isoforms: clinical significance in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, vol. 87(Supl. 1), páginas S3–10, 2004. ISSN 0167-6806.
- GRIESHABER, D., MACKENZIE, R., VÖRÖS, J. y REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors -Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, vol. 8(January), páginas 1400–1458, 2008. ISSN 1424-8220.
- JANG, A., ZOU, Z., LEE, K. K., AHN, C. H. y BISHOP, P. L. State-of-the-art lab chip sensors for environmental water monitoring. *Measurement Science and Technology*, vol. 22(3), página 032001, 2011. ISSN 0957-0233.

- KARLSON, E. W., CHIBNIK, L. B., TWOROGGER, S. S., LEE, I.-M., BURING, J. E., SHADICK, N. A., MANSON, J. E. y COSTENBADER, K. H. Biomarkers of inflammation and development of rheumatoid arthritis in women from two prospective cohort studies. *Arthritis and rheumatism*, vol. 60(3), páginas 641–52, 2009. ISSN 0004-3591.
- KATCHY, A. y WILLIAMS, C. Profiling of Estrogen-regulated MicroRNAs in Breast Cancer Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (84), páginas e51285–e51285, 2014. ISSN 1940-087X.
- KIM, H.-J., CUI, X., HILSENBECK, S. G. y LEE, A. V. Progesterone receptor loss correlates with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 12(3 Pt 2), páginas 1013s–1018s, 2006. ISSN 1078-0432.
- KIM, M.-S., PINTO, S. M., GETNET, D., NIRUJOGI, R. S., MANDA, S. S., CHAERKADY, R., MADUGUNDU, A. K., KELKAR, D. S., ISSERLIN, R., JAIN, S., THOMAS, J. K., MUTHUSAMY, B., LEAL-ROJAS, P., KUMAR, P., SAHASRABUDDHE, N. A., BALAKRISHNAN, L., ADVANI, J., GEORGE, B., RENUSE, S., SELVAN, L. D. N., PATIL, A. H., NANJAPPA, V., RADHAKRISHNAN, A., PRASAD, S., SUBBANNAYYA, T., RAJU, R., KUMAR, M., SREENIVASAMURTHY, S. K., MARIMUTHU, A., SATHE, G. J., CHAVAN, S., DATTA, K. K., SUBBANNAYYA, Y., SAHU, A., YELAMANCHI, S. D., JAYARAM, S., RAJAGOPALAN, P., SHARMA, J., MURTHY, K. R., SYED, N., GOEL, R., KHAN, A. A., AHMAD, S., DEY, G., MUDGAL, K., CHATTERJEE, A., HUANG, T.-C., ZHONG, J., WU, X., SHAW, P. G., FREED, D., ZAHARI, M. S., MUKHERJEE, K. K., SHANKAR, S., MAHADEVAN, A., LAM, H., MITCHELL, C. J., SHANKAR, S. K., SATISHCHANDRA, P., SCHROEDER, J. T., SIRDESHMUKH, R., MAITRA, A., LEACH, S. D., DRAKE, C. G., HALUSHKA, M. K., PRASAD, T. S. K., HRUBAN, R. H., KERR, C. L., BADER, G. D., IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., GOWDA, H. y PANDEY, A. A draft map of the human proteome. *Nature*, vol. 509(7502), páginas 575–581, 2014. ISSN 0028-0836.
- KONECNY, G., PAULETTI, G., PEGRAM, M., UNTCH, M., DANDEKAR, S., AGUILAR, Z., WILSON, C., RONG, H.-M., BAUERFEIND, I., FELBER, M., WANG, H.-J., BERYT, M., SESHADRI, R., HEPP, H. y SLAMON, D. J. Quantitative Association Between HER-2/neu and Steroid Hormone Receptors in Hormone Receptor-Positive Primary Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 95(2), páginas 142–153, 2003. ISSN 0027-8874.
- DE KOSSODO, S., HOUBA, V. y GRAU, G. E. Assaying tumor necrosis factor concentrations in human serum. A WHO International Collaborative study. *Journal of immunological methods*, vol. 182(1), páginas 107–14, 1995. ISSN 0022-1759.



- KRAMBOVITIS, E., HATZIDAKIS, G., HATZOGLIOU, A., ROMAIN, S., DURAND, A., STEFANAKIS, A. y CASTANAS, E. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer microsamples simultaneously quantified by enzyme-ligand immunoassay. *Clinical chemistry*, vol. 41(1), páginas 48–53, 1995. ISSN 0009-9147.
- LAW, W.-C., YONG, K.-T., BAEV, A. y PRASAD, P. N. Sensitivity improved surface plasmon resonance biosensor for cancer biomarker detection based on plasmonic enhancement. *ACS nano*, vol. 5(6), páginas 4858–64, 2011. ISSN 1936-086X.
- LI, T., SI, Z., HU, L., QI, H. y YANG, M. Prussian Blue-functionalized ceria nanoparticles as label for ultrasensitive detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 171-172, páginas 1060–1065, 2012a. ISSN 09254005.
- LI, T., SI, Z., HU, L., QI, H. y YANG, M. Prussian Blue-functionalized ceria nanoparticles as label for ultrasensitive detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 171-172, páginas 1060–1065, 2012b. ISSN 09254005.
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C. y LUNDSTRÖM, I. Biosensing with surface plasmon resonance—how it all started. *Biosensors & bioelectronics*, vol. 10(8), páginas i–ix, 1995. ISSN 0956-5663.
- LIU, Y., ZHOU, Q. y REVZIN, A. An aptasensor for electrochemical detection of tumor necrosis factor in human blood. *The Analyst*, vol. 138(15), páginas 4321–6, 2013. ISSN 1364-5528.
- LOAIZA, O., CAMPUZANO, S., PEDRERO, M., PIVIDORI, M. I., GARCÍA, P. y PINGARRÓN, J. M. Disposable magnetic DNA sensors for the determination at the attomolar level of a specific enterobacteriaceae family gene. *Analytical chemistry*, vol. 80(21), páginas 8239–45, 2008. ISSN 1520-6882.
- LUNDBLAD, R. L. *Development and application of biomarkers*. CRC Press, 2011. ISBN 9781439819807.
- LUO, L., ZHANG, Z. y MA, L. Determination of recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  in serum by chemiluminescence imaging. *Analytica Chimica Acta*, vol. 539(1-2), páginas 277–282, 2005a. ISSN 00032670.
- LUO, L., ZHANG, Z. y MA, L. Determination of recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  in serum by chemiluminescence imaging. *Analytica Chimica Acta*, vol. 539(1-2), páginas 277–282, 2005b. ISSN 00032670.
- MAHFOUD, O. K., RAKOVICH, T. Y., PRINA-MELLO, A., MOVIA, D., ALVES, F. y VOLKOV, Y. Detection of ErbB2: nanotechnological solutions for clinical diagnostics. *RSC Advances*, vol. 4(7), página 3422, 2014. ISSN 2046-2069.

- MARQUES, R. C. B., VISWANATHAN, S., NOUWS, H. P. A., DELERUE-MATOS, C. y GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B. N. Electrochemical immunosensor for the analysis of the breast cancer biomarker HER2 ECD. *Talanta*, vol. 129, páginas 594–9, 2014. ISSN 1873-3573.
- MARTIN, M., ANGELONI, S., GARCIA-MORALES, P., SHOLLER, P., CASTRO-GALACHE, M., FERRAGUT, J. y SACEDA, M. Regulation of estrogen receptor-alpha expression in MCF-7 cells by taxol. *Journal of Endocrinology*, vol. 180(3), páginas 487–496, 2004a. ISSN 0022-0795.
- MARTIN, M. B., ANGELONI, S. V., GARCIA-MORALES, P., SHOLLER, P. F., CASTRO-GALACHE, M. D., FERRAGUT, J. A. y SACEDA, M. Regulation of estrogen receptor-alpha expression in MCF-7 cells by taxol. *The Journal of endocrinology*, vol. 180(3), páginas 487–96, 2004b. ISSN 0022-0795.
- MARTIN, V. S., SULLIVAN, B. A., WALKER, K., HAWK, H., SULLIVAN, B. P. y NOE, L. J. Surface plasmon resonance investigations of human epidermal growth factor receptor 2. *Applied spectroscopy*, vol. 60(9), páginas 994–1003, 2006. ISSN 0003-7028.
- MARTÍNEZ-BORRA, J., LÓPEZ-LARREA, C., GONZÁLEZ, S., FUENTES, D., DIEGUEZ, A., DESCHAMPS, E. M., PÉREZ-PARIENTE, J. M., LÓPEZ-VÁZQUEZ, A., DE FRANCISCO, R. y RODRIGO, L. High serum tumor necrosis factor-alpha levels are associated with lack of response to infliximab in fistulizing Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*, vol. 97(9), páginas 2350–6, 2002. ISSN 0002-9270.
- MARTINEZ-PERDIGUERO, J., RETOLAZA, A., BUJANDA, L. y MERINO, S. Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF $\alpha$  biomarker in human serum. *Talanta*, vol. 119, páginas 492–7, 2014a. ISSN 1873-3573.
- MARTINEZ-PERDIGUERO, J., RETOLAZA, A., BUJANDA, L. y MERINO, S. Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF $\alpha$  biomarker in human serum. *Talanta*, vol. 119, páginas 492–7, 2014b. ISSN 1873-3573.
- MASSON, J.-E., BATTAGLIA, T. M., CRAMER, J., BEAUDOIN, S., SIERKS, M. y BOOKSH, K. S. Reduction of nonspecific protein binding on surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 386(7-8), páginas 1951–1959, 2006. ISSN 1618-2642.
- MAZLOUM-ARDAKANI, M., HOSSEINZADEH, L. y TALEAT, Z. Two kinds of electrochemical immunoassays for the tumor necrosis factor  $\alpha$  in human serum using screen-printed graphite electrodes modified with poly(anthranilic acid). *Microchimica Acta*, vol. 181(9-10), páginas 917–924, 2014. ISSN 0026-3672.
- MICHAEL GREEN, N. *Avidin-Biotin Technology*, vol. 184 de *Methods in Enzymology*. Elsevier, 1990. ISBN 9780121820855.

- MOHAMMED, H., RUSSELL, I. A., STARK, R., RUEDA, O. M., HICKEY, T. E., TARULLI, G. A., SERANDOUR, A. A. A., BIRRELL, S. N., BRUNA, A., SAADI, A., MENON, S., HADFIELD, J., PUGH, M., RAJ, G. V., BROWN, G. D., D'SANTOS, C., ROBINSON, J. L. L., SILVA, G., LAUNCHBURY, R., PEROU, C. M., STINGL, J., CALDAS, C., TILLEY, W. D. y CARROLL, J. S. Progesterone receptor modulates ER $\alpha$  action in breast cancer. *Nature*, vol. 523(7560), páginas 313–317, 2015. ISSN 0028-0836.
- DE MOL, N. J. y FISCHER, M. J. E., editores. *Surface Plasmon Resonance - Methods and Protocols*. Springer Protocols, 2010. ISBN 978-1-60761-669-6.
- MUCELLI, S. P., ZAMUNER, M., TORMEN, M., STANTA, G. y UGO, P. Nanoelectrode ensembles as recognition platform for electrochemical immunosensors. *Biosensors & bioelectronics*, vol. 23(12), páginas 1900–3, 2008. ISSN 0956-5663.
- MYSZKA, D. G. Improving biosensor analysis. *Journal of Molecular Biorecognition*, vol. 12, páginas 279–284, 1999.
- NAHAVANDI, S., BARATCHI, S., SOFFE, R., TANG, S.-Y., NAHAVANDI, S., MITCHELL, A. y KHOSHMANESH, K. Microfluidic platforms for biomarker analysis. *Lab on a chip*, vol. 14(9), páginas 1496–514, 2014. ISSN 1473-0189.
- NAMAS, R., GHUMA, A., TORRES, A., POLANCO, P., GOMEZ, H., BARCLAY, D., GORDON, L., ZENKER, S., KIM, H. K., HERMUS, L., ZAMORA, R., ROSENGART, M. R., CLERMONT, G., PEITZMAN, A., BILLIAR, T. R., OCHOA, J., PINSKY, M. R., PUYANA, J. C. y VODOVOTZ, Y. An adequately robust early TNF-alpha response is a hallmark of survival following trauma/hemorrhage. *PloS one*, vol. 4(12), página e8406, 2009. ISSN 1932-6203.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, vol. 420(6917), páginas 846–852, 2002. ISSN 0028-0836.
- ORDÁS, I., FEAGAN, B. G. y SANDBORN, W. J. Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor antagonists in inflammatory bowel disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, vol. 10(10), páginas 1079–87; quiz e85–6, 2012. ISSN 1542-7714.
- PALECEK, E. y FOJTA, M. Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta*, vol. 74(3), páginas 276–90, 2007. ISSN 1873-3573.
- PAPADOPOULOU, E., TRIPSANIS, G., ANAGNOSTOPOULOS, K., TENTES, I., KAKOLYRIS, S., GALAZIOS, G., SIVRIDIS, E., SIMOPOULOS, K. y KORTSARIS, A. Significance of serum tumor necrosis factor-alpha and its combination with HER-2 codon 655 polymorphism in the diagnosis and prognosis of breast cancer. *The International Journal of Biological Markers*, vol. 25(3), páginas 126–135, 2010.

- PATANI, N., MARTIN, L.-A. y DOWSETT, M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. *International journal of cancer*, vol. 133(1), páginas 1–13, 2013. ISSN 1097-0215.
- PATRIS, S., DE PAUW, P., VANDEPUT, M., HUET, J., VAN ANTWERPEN, P., MUYLDERMANS, S. y KAUFFMANN, J.-M. Nanoimmunoassay onto a screen printed electrode for HER2 breast cancer biomarker determination. *Talanta*, vol. 130, páginas 164–70, 2014. ISSN 1873-3573.
- PAWLAK, K. y WIEBE, J. Regulation of estrogen receptor (ER) levels in MCF-7 cells by progesterone metabolites. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 107(3), páginas 172–179, 2007. ISSN 09600760.
- POLLARD, T. D. A guide to simple and informative binding assays. *Molecular biology of the cell*, vol. 21(23), páginas 4061–4067, 2010. ISSN 1059-1524.
- PUI, T. S., KONGSUPHOL, P., ARYA, S. K. y BANSAL, T. Detection of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in cell culture medium with label free electrochemical impedance spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 181, páginas 494–500, 2013. ISSN 09254005.
- QURESHI, A., NIAZI, J. H., KALLEMPUDI, S. y GURBUZ, Y. Label-free capacitive biosensor for sensitive detection of multiple biomarkers using gold interdigitated capacitor arrays. *Biosensors & bioelectronics*, vol. 25(10), páginas 2318–23, 2010. ISSN 1873-4235.
- RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN clinical issues*, vol. 15(1), páginas 3–17, 2004. ISSN 1079-0713.
- RIFAI, N., GILLETTE, M. A. y CARR, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature Biotechnology*, vol. 24(8), páginas 971–983, 2006. ISSN 1087-0156.
- RONDÓN-LAGOS, M., VERDUN DI CANTOGNO, L., MARCHIÒ, C., RANGEL, N., PAYAN-GOMEZ, C., GUGLIOTTA, P., BOTTA, C., BUSSOLATI, G., RAMÍREZ-CLAVIJO, S. R., PASINI, B., SAPINO, A., KAO, J., SALARI, K., BOCANEGRA, M., CHOI, Y., GIRARD, L., GANDHI, J., KWEI, K., HERNANDEZ-BOUSSARD, T., WANG, P., GAZDAR, A., KYTOLA, S., RUMMUKAINEN, J., NORDGREN, A., KARHU, R., FARNEBO, F., ISOLA, J., LARSSON, C., LACROIX, M., LECLERCQ, G., NEVE, R., CHIN, K., FRIDLYAND, J., YEH, J., BAEHNER, F., FEVR, T., CLARK, L., BAYANI, N., COPPE, J., TONG, F., PEROU, C., SORLIE, T., EISEN, M., VAN DE RIJN, M., JEFFREY, S., REES, C., POLLACK, J., ROSS, D., JOHNSEN, H., AKSLEN, L., SORLIE, T., PEROU, C., TIBSHIRANI, R., AAS, T., GEISLER, S., JOHNSEN, H., HASTIE, T., EISEN, M., VAN DE RIJN, M., JEFFREY, S., VEER, L. V. T., DAI, H., DE VIJVER, M. V., HE, Y., HART, A., MAO, M., PETERSE, H., DER KOOY, K. V., MARTON, M., WITTEVEEN, A., GOLDBIRSCH, A., WOOD, W., COATES, A., GELBER, R., THURLIMANN, B., SENN, H., BORGNA, S., ARMELLIN, M., GENNARO, A. D., MAESTRO, R., SANTAROSA, M.,

- SUBIK, K., LEE, J., BAXTER, L., STRZEPEK, T., COSTELLO, D., CROWLEY, P., XING, L., HUNG, M., BONFIGLIO, T., HICKS, D., TANG, P., GRIGORIADIS, A., MACKAY, A., NOEL, E., WU, P., NATRAJAN, R., FRANKUM, J., REIS-FILHO, J., TUTT, A., JONSSON, G., STAAE, J., OLSSON, E., HEIDENBLAD, M., VALLON-CHRISTERSSON, J., OSOEGAWA, K., JONG, P. D., OREDSSON, S., RINGNER, M., HOGLUND, M., BORG, A., SHADEO, A., LAM, W., DAVIDSON, J., GORRINGE, K., CHIN, S., ORSETTI, B., BESRET, C., COURTAY-CAHEN, C., ROBERTS, I., THEILLET, C., CALDAS, C., EDWARDS, P., GASPARINI, P., BERTOLINI, G., BINDA, M., MAGNIFICO, A., ALBANO, L., TORTORETO, M., PRATESI, G., FACCHINETTI, F., ABOLAFIO, G., ROZ, L., LU, Y., MORRIS, J., EDWARDS, P., SHIPLEY, J., BAATOUT, S., DELLAS, A., TORHORST, J., SCHULTHEISS, E., MIHATSCH, M., MOCH, H., GUDMUNDSSON, J., BARKARDOTTIR, R., EIRIKSDOTTIR, G., BALDURSSON, T., ARASON, A., EGILSSON, V., INGVARSSON, S., KARNIK, P., PARIS, M., WILLIAMS, B., CASEY, G., CROWE, J., CHEN, P., WINQVIST, R., HAMPTON, G., MANNERMAA, A., BLANCO, G., ALAVAikko, M., KIVINIEMI, H., TASKINEN, P., EVANS, G., WRIGHT, E., NEWSHAM, I., XU, X., WU, L., DU, F., DAVIS, A., PEYTON, M., TOMIZAWA, Y., MAITRA, A., TOMLINSON, G., GAZDAR, A., WEISSMAN, B., MARCHIO, C., LAMBROS, M., GUGLIOTTA, P., CANTOGNO, L. D., BOTTA, C., PASINI, B., TAN, D., MACKAY, A., FENWICK, K., TAMBER, N., SAPINO, A., GOIA, M., RECUPERO, D., MARCHIO, C., HIRATA, K., TAGAWA, Y., KASHIMA, K., KIDOGAWA, H., DEGUCHI, M., TSUJI, T., AYABE, H., AKA, J., LIN, S., BENZ, C., SCOTT, G., SARUP, J., JOHNSON, R., TRIPATHY, D., CORONADO, E., SHEPARD, H., OSBORNE, C., CUI, J., GERMER, K., WU, T., WANG, J., LUO, J., WANG, S., WANG, Q., ZHANG, X., TARI, A., LIM, S., HUNG, M., ESTEVA, F., LOPEZ-BERESTEIN, G., ALBERTSON, D., COLLINS, C., MCCORMICK, F., GRAY, J., WILLMAN, C., RA, H., RAJAGOPALAN, H., LENGAUER, C., WILSON, K., ROBERTS, H., LEEK, R., HARRIS, A. y GERADTS, J. Differences and homologies of chromosomal alterations within and between breast cancer cell lines: a clustering analysis. *Molecular Cytogenetics*, vol. 7(1), página 8, 2014. ISSN 1755-8166.
- RONKAINEN, N. J., HALSALL, H. B., HEINEMAN, W. R., GRIESHABER, D., MACKENZIE, R., VÖRÖS, J., REIMHULT, E., RONKAINEN-MATSUNO, N. J., THOMAS, J. H. y AL., E. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, vol. 39(5), página 1747, 2010. ISSN 0306-0012.
- RONKAINEN-MATSUNO, N. J., THOMAS, J. H., HALSALL, H. y HEINEMAN, W. R. Electrochemical immunoassay moving into the fast lane. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21(4), páginas 213–225, 2002. ISSN 01659936.
- RUSLING, J. F. Multiplexed electrochemical protein detection and translation to personalized cancer diagnostics. *Analytical chemistry*, vol. 85(11), páginas 5304–10, 2013. ISSN 1520-6882.
- SANTILLÁN-BENÍTEZ, J. G., NEZ, Q.-O., MENDIETA-ZERÓN, H. y GÓMEZ-OLIVÁN, L. M. Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. El ca-

- mino hacia la búsqueda de terapias preventivas. *Revista de Medicina e Investigación*, vol. 1(1), páginas 17–24, 2013. ISSN 2214-3106.
- SCULLY, P., MCKERNAN, D. P., KEOHANE, J., GROEGER, D., SHANAHAN, E., DINAN, T. G. y QUIGLEY, E. M. M. Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity. *The American journal of gastroenterology*, vol. 105(10), páginas 2235–43, 2010. ISSN 1572-0241.
- YÁÑEZ SEDEÑO, P., CAMPUZANO, S. y PINGARRÓN, J. Magnetic Particles Coupled to Disposable Screen Printed Transducers for Electrochemical Biosensing. *Sensors*, vol. 16(10), página 1585, 2016. ISSN 1424-8220.
- SELL, S. Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications. Eleftherios P. Diamandis, Hervert A. Fritche, Hans Lilja, Daniel W. Chan, and Morton K. Schwartz, eds. Washington, DC: AACC Press, 2002, 513 pp., \$99.00 (\$79.00 AACC members), . *Clinical Chemistry*, vol. 49(2), páginas 342 LP – 342, 2003.
- SHI, Y., HUANG, W., TAN, Y., JIN, X., DUA, R., PENUEL, E., MUKHERJEE, A., SPERRINDE, J., PANNU, H., CHENNA, A., DEFazio-ELI, L., PIDAPARTHI, S., BADAL, Y., WALLWEBER, G., CHEN, L., WILLIAMS, S., TAHIR, H., LARSON, J., GOODMAN, L., WHITCOMB, J., PETROPOULOS, C. y WINSLOW, J. A novel proximity assay for the detection of proteins and protein complexes: quantitation of HER1 and HER2 total protein expression and homodimerization in formalin-fixed, paraffin-embedded cell lines and breast cancer tissue. *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B*, vol. 18(1), páginas 11–21, 2009. ISSN 1533-4066.
- SITU, C., WYLIE, A. R. G., DOUGLAS, A. y ELLIOTT, C. T. Reduction of severe bovine serum associated matrix effects on carboxymethylated dextran coated biosensor surfaces. *Talanta*, vol. 76(4), páginas 832–6, 2008. ISSN 1873-3573.
- SIVIK, T. y JANSSON, A. Progesterone and levonorgestrel regulate expression of 17bHSD-enzymes in progesterone receptor positive breast cancer cell line T47D. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 422(1), páginas 109–113, 2012. ISSN 0006291X.
- STOICA, A., SACEDA, M., FAKHRO, A., SOLOMON, H. B., FENSTER, B. D. y MARTIN, M. B. The Role of Transforming Growth Factor- $\beta$  in the Regulation of Estrogen Receptor Expression in the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Endocrinology*, vol. 138(4), páginas 1498–1505, 1997. ISSN 0013-7227.
- SUN, Z., DENG, L., GAN, H., SHEN, R., YANG, M. y ZHANG, Y. Sensitive immunosensor for tumor necrosis factor  $\alpha$  based on dual signal amplification of ferrocene modified self-assembled peptide nanowire and glucose oxidase functionalized gold nanorod. *Biosensors & bioelectronics*, vol. 39(1), páginas 215–9, 2013. ISSN 1873-4235.

- TORRENTE-RODRÍGUEZ, R. M., CAMPUZANO, S., LÓPEZ-HERNÁNDEZ, E., MONTIEL, V. R.-V. N., BARDERAS, R., GRANADOS, R., SÁNCHEZ-PUELLES, J. M. y PINGARRÓN, J. M. Simultaneous detection of two breast cancer-related miRNAs in tumor tissues using p19-based disposable amperometric magnetobiosensing platforms. *Biosensors & bioelectronics*, vol. 66, páginas 385–91, 2015. ISSN 1873-4235.
- TREVIÑO, J., CALLE, A., RODRÍGUEZ-FRADE, J., MELLADO, M. y LECHUGA, L. Determination of human growth hormone in human serum samples by surface plasmon resonance immunoassay. *Talanta*, vol. 78(3), páginas 1011–1016, 2009. ISSN 00399140.
- ULUDAG, Y. y TOTHILL, I. E. Cancer Biomarker Detection in Serum Samples Using Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Sensors with Nanoparticle Signal Amplification. *Analytical Chemistry*, vol. 84(14), páginas 5898–5904, 2012. ISSN 0003-2700.
- UN, F., ZHOU, B. y YEN, Y. The utility of tumor-specifically internalizing peptides for targeted siRNA delivery into human solid tumors. *Anticancer research*, vol. 32(11), páginas 4685–90, 2012. ISSN 1791-7530.
- VIALE, G. The current state of breast cancer classification. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, vol. 23, páginas 207–210, 2012. ISSN 1569-8041.
- VOET, D. y VOET, J. G. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 9780470570951.
- WANG, G., HE, X., CHEN, L., ZHU, Y. y ZHANG, X. Ultrasensitive IL-6 electrochemical immunosensor based on Au nanoparticles-graphene-silica biointerface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 116(1), páginas 714–719, 2014. ISSN 09277765.
- WANG, J. *Analytical electrochemistry*. Wiley-VCH, 2006. ISBN 9780471678793.
- WEI, F., LIAO, W., XU, Z., YANG, Y., WONG, D. T. y HO, C.-M. Bio/abiotic interface constructed from nanoscale DNA dendrimer and conducting polymer for ultrasensitive biomolecular diagnosis. *Small*, vol. 5(15), páginas 1784–90, 2009.
- WENG, S., CHEN, M., ZHAO, C., LIU, A., LIN, L., LIU, Q., LIN, J. y LIN, X. Label-free electrochemical immunosensor based on K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] as signal for facile and sensitive determination of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 184(null), páginas 1–7, 2013a. ISSN 09254005.
- WENG, S., CHEN, M., ZHAO, C., LIU, A., LIN, L., LIU, Q., LIN, J. y LIN, X. Label-free electrochemical immunosensor based on K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] as signal for faci-

- le and sensitive determination of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 184, páginas 1–7, 2013b. ISSN 09254005.
- WIDSCHWENDTER, M., LICHTENBERG-FRATE, H., HASENBRINK, G., SCHWARZER, S., DAWNAY, A., LAM, A., MENON, U., APOSTOLIDOU, S., RAUM, E., STEGMAIER, C., JACOBS, I. J. y BRENNER, H. Serum oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  bioactivity are independently associated with breast cancer: a proof of principle study. *British Journal of Cancer*, vol. 101(1), páginas 160–165, 2009. ISSN 0007-0920.
- WIEBE, J. P., ZHANG, G., WELCH, I., CADIEUX-PITRE, H.-A. T., KEY, T., PIKE, M., HENDERSON, B., FEIGELSON, H., MCGUIRE, W., OSBORNE, C., CLARK, G., KNIGHT, W., AALTOMAA, S., LIPPONEN, P., ESKELINEN, M., KOSMA, V., MARIN, S., ALHAVA, E., SYRJANEN, K., HOWAT, J., HARRIS, M., SWINDELL, R., BARNES, D., TAUCHER, S., RUDAS, M., GNANT, M., THOMANEK, K., DUBSKY, P., ROKA, S., BACHLEITNER, T., KANDIOLER, D., WENZEL, C., STEGER, G., MITTLBÖCK, M., JAKESZ, R., REXHEPAJ, E., BRENNAN, D., HOLLOWAY, P., KAY, E., MCCANN, A., LANDBERG, G., DUFFY, M., JIRSTROM, K., GALLAGHER, W., ROBINSON, G., HENNIGHAUSEN, L., JOHNSON, P., PAONE, J., ABELOFF, M., ETTINGER, D., ARNOLD, E., BAKER, P., VOLLENWEIDER-ZERARGUI, L., BARRELET, L., WONG, Y., LEMARCHAND-BÉRAUD, T., GÓMEZ, F., FISHER, B., REDMOND, C., FISHER, E., CAPLAN, R., BARDOU, V.-J., ARPINO, G., ELLEDGE, R., OSBORNE, C., CLARK, G., DUNNWALD, L., ROSSING, M., LI, C., WIEBE, J., MUZIA, D., HU, J., SZWAJECER, D., HILL, S., SEACHRIST, J., WIEBE, J., LEWIS, M., WIEBE, J., WIEBE, J., BEAUSOLEIL, M., ZHANG, G., CIALACU, V., WEILER, P., WIEBE, J., WIEBE, J., BARR, K., BUCKINGHAM, K., ERLANGER, B., BOREK, F., BEISER, S., LIEBERMAN, S., NAAR, J., BRANAA, P., CHINAIN, M., PAUILLAC, S., WIEBE, J., DELINE, C., BUCKINGHAM, K., DAVE, V., STOTHERS, J., PRICE, J., POLYZOS, A., ZHANG, R., DANIELS, L., OSBORNE, C., YOCHMOWITZ, M., KNIGHT, W., MCGUIRE, W., CIOCCA, D., ELLEDGE, R., JIANG, S.-Y., JORDAN, V., LIN, V., ENG, A., HEN, N., NG, E., CHOWDHURY, S., PAWLAK, K., ZHANG, G., WIEBE, J., WIEBE, J., LEWIS, M., CIALACU, V., PAWLAK, K., ZHANG, G., WIEBE, J., MUZIA, D., BECK, C., WOLFE, M., MURPHY, L., WIEBE, J., LEWIS, M., WIEBE, J., HEATHCOTE, J., ABUL-HAJJ, Y., IVERSON, R., KIANG, D., GUNASEGARAM, R., PEH, K., LOGANATH, A., RATNAM, S., SUTHERLAND, R., KENNY, P., BISSELL, M., HAYASHI, S.-I., YAMAGUCHI, Y., HU, M., POLYAK, K., WILSON, C., HOLEN, I., COLEMAN, R., FUQUA, S., MURPHY, L., PAWLAK, K. y WIEBE, J. Progesterone metabolites regulate induction, growth, and suppression of estrogen- and progesterone receptor-negative human breast cell tumors. *Breast Cancer Research*, vol. 15(3), página R38, 2013. ISSN 1465-5411.
- XIAO, Y., GAO, X., MARAGH, S., TELFORD, W. G. y TONA, A. Cell Lines as Candidate Reference Materials for Quality Control of ERBB2 Amplification and Expression Assays in Breast Cancer. *Clinical Chemistry*, vol. 55(7), 2009.



- YIN, Z., LIU, Y., JIANG, L.-P. y ZHU, J.-J. Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor  $\alpha$  based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres. *Biosensors & bioelectronics*, vol. 26(5), páginas 1890–4, 2011. ISSN 1873-4235.
- YOON, J.-Y. y KIM, B. Lab-on-a-Chip Pathogen Sensors for Food Safety. *Sensors*, vol. 12(12), páginas 10713–10741, 2012. ISSN 1424-8220.
- ZHANG, Y., GONZALEZ, R. M. y ZANGAR, R. C. Protein secretion in human mammary epithelial cells following HER1 receptor activation: influence of HER2 and HER3 expression. *BMC cancer*, vol. 11(1), página 69, 2011. ISSN 1471-2407.
- ZHU, S., CAO, Y., XU, Y., YIN, Y. y LI, G. An Exonuclease III Protection-Based Electrochemical Method for Estrogen Receptor Assay. *International Journal of Molecular Sciences 2013, Vol. 14, Pages 10298-10306*, vol. 14(5), páginas 10298–10306, 2013a.
- ZHU, S., CAO, Y., YE, Z., YIN, Y. y ZHU, X. Electrochemical assay of the relationship between the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase pathway and estrogen receptor expression in breast cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405(29), páginas 9593–9596, 2013b. ISSN 1618-2642.
- ZHU, Y., CHANDRA, P. y SHIM, Y.-B. Ultrasensitive and selective electrochemical diagnosis of breast cancer based on a hydrazine-Au nanoparticle-aptamer bioconjugate. *Analytical chemistry*, vol. 85(2), páginas 1058–64, 2013c. ISSN 1520-6882.

# Acrónimos

**1-NP** 1-naftil fosfato

**4-ABA** Ácido 4-aminobenzoico

**Ag** plata

**antiER $\alpha$**  Anticuerpo de captura anti-ER $\alpha$

**antiErbB2** Anticuerpo de captura anti-ErbB2

**antiErbB2-HRP** Anticuerpo de detección anti-ErbB2 conjugado con HRP

**antiPR** Anticuerpo de captura anti-PR

**antiTNF $\alpha$**  Anticuerpo de captura anti-TNF $\alpha$

**AP** Fosfatasa alcalina

**ATR** Reflexión Total Atenuada

**AuNPs** Nanopartículas de oro

**biotina-antiER $\alpha$**  Anticuerpo de detección anti-ER $\alpha$  biotinilado

**biotina-antiErbB2** Anticuerpo de detección anti-ErbB2 biotinilado

**biotina-antiPR** Anticuerpo de detección anti-PR biotinilado

**biotina-antiTNF $\alpha$**  Anticuerpo de detección anti-TNF $\alpha$  biotinilado

**BSA** Albúmina de suero bovino

**C** Concentración

**CA** Cronoamperometría

**CE** Electrodo Auxiliar o Contraelectrodo

**CRP** Proteína C Reactiva

---

<b>CV</b>	Voltamperometría Cíclica
<b>DEA</b>	Dietanolamina
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DPV</b>	Voltamperometría Diferencial de Impulsos
<b>ECL</b>	Electroquimioluminiscencia
<b>EDC</b>	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EIS</b>	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
<b>EMSA</b>	Ensayo de Cambio de Movilidad Electroforética
<b>EQ</b>	Electroquímica
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor de Estrógeno alfa
<b>ErbB2</b>	Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico 2
<b>ETA-HCl</b>	Clohidrato de etanolamina
<b>EtOH</b>	Etanol absoluto
<b>FISH</b>	Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua desionizada ultrapura
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HIgG</b>	Inmunoglobulina G humana
<b>HOOC-MBs</b>	Micropartículas magnéticas modificadas con ácido carboxílico
<b>HQ</b>	Hidroquinona
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HSA</b>	Albúmina de suero humano
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón $\gamma$
<b>IHC</b>	Inmunohistoquímica

---

<b>IL10</b>	Interleuquina 10
<b>IL12</b>	Interleuquina 12
<b>IL1<math>\alpha</math></b>	Interleuquina 1 $\alpha$
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 $\beta$
<b>IL2</b>	Interleuquina 2
<b>IL4</b>	Interleuquina 4
<b>IL5</b>	Interleuquina 5
<b>IL6</b>	Interleuquina 6
<b>IL8</b>	Interleuquina 8
<b>IR</b>	Índice de Refracción
<b>K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>)</b>	Ferricianuro de Potasio
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de Equilibrio
<b>LBA</b>	Ensayos de Unión a Ligando
<b>LD</b>	Límite de Detección
<b>LQ</b>	Límite de Cuantificación
<b>LSV</b>	Voltamperometría de Barrido Lineal
<b>LiClO<sub>4</sub></b>	Perclorato de litio
<b>MBs</b>	Partículas Magnéticas
<b>MES</b>	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>MIgG</b>	Inmunoglobulina G de ratón
<b>MUA</b>	Ácido 11-mercaptoundecanoico
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Hidrogenofosfato disódico anhidro
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Dihidrogenofosfato de sodio anhidro

---

<b>NaOAc</b>	Acetato de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NHS</b>	N-Hidroxisuccinimida
<b>POC</b>	Point of Care
<b>PR</b>	Receptor de Progesterona
<b>qPCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
$R^2$	Coefficiente de Correlación
<b>RE</b>	Electrodo de Referencia
<b>RSD</b>	Desviación Estándar Relativa
<b>RU</b>	Unidades de Respuesta
<b>S</b>	Señal medida
<b>S/B</b>	señal/ruido
<b>SAM</b>	Monocapa Autoensamblada
<b>SAv</b>	Estreptavidina
<b>SAv-AP</b>	Conjugado de estreptavidina con AP
<b>SAv-AuNPs</b>	Nanopartículas de oro funcionalizadas con estreptavidina
<b>SAv-HRP</b>	Conjugado de estreptavidina con HRP
<b>SD</b>	Desviación Estándar
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico
<b>SPCE</b>	Electrodo desechable de Carbono para determinación dual
<b>SPCE</b>	Electrodo desechable de Carbono para determinación individual
<b>SPR</b>	Resonancia de Plasmón Superficial
<b>SWSV</b>	Voltamperometría de Redisolución de Onda Cuadrada
<b>SWV</b>	Voltamperometría de Onda Cuadrada
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>Tris-HCl</b>	Clohidrato de tris(hidroximetil)aminometano

**Tween** Tween<sup>®</sup> 20

**WE** Electrodo de Trabajo



## **Publicaciones derivadas**





# Amperometric magnetoimmunoassay for the direct detection of tumor necrosis factor alpha biomarker in human serum



U. Eletxigerra<sup>a,b</sup>, J. Martinez-Perdiguero<sup>b,\*</sup>, S. Merino<sup>a,b</sup>, R. Villalonga<sup>c</sup>, J.M. Pingarrón<sup>c</sup>, S. Campuzano<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Micro-NanoFabrication Unit, IK4-Tekniker, Eibar, Spain

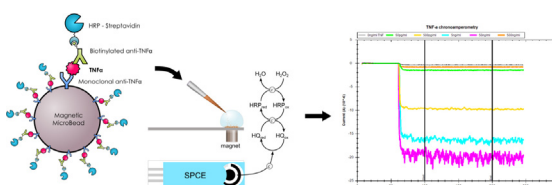
<sup>b</sup> CIC microGUNE, Arrasate-Mondragón, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

## HIGHLIGHTS

- Electrochemical magnetoimmuno-sensor for tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) biomarker.
- Sensitive and selective detection of TNF $\alpha$  in undiluted serum.
- LOD achieved lower than the cut-off value established for relevant illnesses.
- Useful and affordable alternative to ELISAs for TNF $\alpha$  determination in serum.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 26 March 2014

Received in revised form 22 May 2014

Accepted 27 May 2014

Available online 2 June 2014

### Keywords:

Electrochemical

Human serum

Immunoassay

Magnetic beads

Tumor necrosis factor alpha

## ABSTRACT

An amperometric immunoassay for the determination of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) protein biomarker in human serum based on the use of magnetic microbeads (MBs) and disposable screen-printed carbon electrodes (SPCEs) has been developed. The specifically modified microbeads were magnetically captured on the working electrode surface and the amperometric responses were measured at  $-0.20$  V (vs. Ag pseudo-reference electrode), upon addition of hydroquinone (HQ) as electron transfer mediator and  $H_2O_2$  as the enzyme substrate. After a thorough optimization of the assay, extremely low limits of detection were achieved:  $2.0 \text{ pg mL}^{-1}$  (36 fM) and  $5.8 \text{ pg mL}^{-1}$  (105 fM) for standard solutions and spiked human serum, respectively. The simplicity, robustness and this clinically interesting LOD proved the developed TNF $\alpha$  immunoassay as a good contender for real clinical application.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Tumor necrosis factor- $\alpha$  protein (TNF $\alpha$ ) is a pro-inflammatory cytokine secreted by activated macrophages that plays a relevant role in a wide variety of immune and inflammatory processes [1]. It is present in serum as a biologically active molecule in the form of a

55 kDa homotrimer whose concentration increases when the inflammatory cascade is activated, which makes TNF $\alpha$  a very attractive protein biomarker for several pathologies [2]. Therefore, the determination of TNF $\alpha$  concentration in real samples is highly interesting for many immunological studies. A worth-mentioning case is that of rheumatoid arthritis or Crohn's disease, in which the binding inhibition of circulating TNF $\alpha$  by biological drugs significantly alleviates the symptoms [3]. It has been suggested that the knowledge of circulating TNF $\alpha$  levels could improve the drug dosage to reduce the high treatment costs and to avoid

\* Corresponding authors.

E-mail address: [susanacr@quim.ucm.es](mailto:susanacr@quim.ucm.es) (S. Campuzano).

unnecessary side effects [4]. Other authors have studied also the prognostic effect and the effect of chemotherapy on serum levels of TNF $\alpha$  in patients with advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC) [5].

Normal concentrations of circulating TNF $\alpha$  lie on the range of a few pg mL<sup>-1</sup> [2] and, consequently, the assay of TNF $\alpha$  in blood or serum requires extremely sensitive detection methods. The current gold-standard method for assaying TNF $\alpha$  levels remains being the conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, ELISA methods are difficult to be automated, miniaturized and performed with cost-effective instrumentation and hence hardly used *in situ* and not recommended to perform routine and decentralized analyses. As a result, the use of this marker is not widespread in clinic and is only used to research level. With the aim of overcoming these limitations, a wide variety of assays and biosensor techniques including optical, acoustic, capacitive and electrochemical methods have been reported for the detection of TNF $\alpha$ . However, probably due to the unavoidable difficulty added by the matrix effects, only a few works deal with clinically interesting samples such as blood or serum. Martinez-Perdiguero et al. used a surface plasmon resonance (SPR) immunoassay for the detection of TNF $\alpha$  in 25% serum and, via gold nanoparticle signal amplification, achieved a LOD of 54.4 pg mL<sup>-1</sup> [6]. Luo et al. employed chemiluminescence imaging and carried out recovery tests in serum [7]. Using different electrochemical approaches, several authors have reported TNF $\alpha$  assays in complex media: Liu et al. developed an aptasensor using methylene blue as a label and square wave voltammetry (SWV) measurements to obtain a LOD of 10,000 pg mL<sup>-1</sup> in pure blood [8]; Sun et al. used self-assembled peptide nanowires, glucose oxidase functionalized gold nanorods and SWV [9]; Weng et al. proposed a label-free strategy based on K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] and cyclic voltammetry (CV) [10]; and finally, Li et al. employed Prussian Blue-functionalized ceria nanoparticles and CV [11]. Despite the very low LODs reported in some of the mentioned assays, their inherent complexity can prevent them from reaching clinical use.

MBs are a powerful and versatile tool employed in a variety of analytical applications, including electrochemical immunosensing [12]. They facilitate efficient target analyte retrieval and concentration, largely reduce the assay time and allow easy application of analytical procedures to higher sample throughput and automation [13]. Its use minimizes matrix effect due to washing and separation procedures and allows faster assay kinetics to be achieved because the beads are in suspension and the analytical target does not have to migrate very fast [14]. The use of MBs has also been considered a methodological approach that enhances sensitivity and reduces detection time in electrochemical immunosensors and hence different electrochemical magnetosensing approaches have been successfully applied to the detection of relevant clinical biomarkers [15,16]. Interestingly, Betazzi et al. reported an electrochemical bioassay including MBs and alkaline phosphatase (AP) as enzymatic label for the detection of TNF $\alpha$  [17]. Using ELISA reagents and a sample diluting solution as serum-mimic, they reached a LOD of 44 pg mL<sup>-1</sup>. As they suggested, this value was still an order of magnitude larger than it is necessary for real clinical interest [2] and further investigations in real samples are necessary.

In order to achieve the direct determination of ultralow concentrations of TNF $\alpha$  in undiluted human serum, we report here an amperometric magnetimmunoassay using a sandwich configuration, SPCEs and HOOC-modified MBs (HOOC-MBs). The developed methodology involved the immobilization of the capture antibody on the HOOC-MBs, and successive incubation steps of the modified MBs with the analyte, a specific biotin-labeled detection antibody and a streptavidin-horseradish

peroxidase (SAv-HRP) conjugate. Amperometric measurements at -0.20 V (vs. the Ag pseudo-reference electrode) of the enzyme reaction product were carried out at SPCEs using HQ as electron transfer mediator and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the enzyme substrate. The implemented magnetimmunoassay, tested against standard solutions and spiked human serum samples, demonstrated a much better performance in serum samples than the only one electrochemical magnetobioassay reported previously [17].

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

For all the experiments, carboxylic acid-modified MBs (HOOC-MBs, 2.8  $\mu$ m, 30 mg mL<sup>-1</sup> Dynabeads M-270 carboxylic acid) from Invitrogen were used as received. Recombinant human TNF $\alpha$  protein, monoclonal mouse anti-human TNF $\alpha$  (anti-TNF $\alpha$ ) as capture and biotinylated polyclonal rabbit anti-TNF $\alpha$  (biotin-anti-TNF $\alpha$ ) as detector antibodies were purchased from PeproTech (Refs. AF-300-01A, 500-M26 and 500-P31ABT, respectively). A TNF $\alpha$  ELISA Kit, was purchased from Immunotech (ref. IM1121). Mouse immunoglobulin G (MIgG), human immunoglobulin G (HIgG), bovine serum albumin (BSA) and streptavidin conjugated HRP enzymatic label (SAv-HRP) were from Jackson ImmunoResearch (Refs. 015-000-003, 009-000-003, 001-000-161 and 016-030-084 respectively). Human serum from human male AB plasma was purchased from Sigma (Ref. H4522). Moreover, a serum sample from a patient with a non-detectable TNF $\alpha$  concentration (analyzed by the commercial ELISA method) was used to perform the recovery studies.

*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), ethanolamine hydrochloride, hydroquinone (HQ) and Tween 20 were from Sigma-Aldrich. Sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), sodium chloride and potassium chloride were purchased from Scharlau. All other chemicals were of analytical grade and ultrapure water (Millipore Milli-Q) was used for all solutions and buffers.

The buffers and solutions employed in this work were: 0.01 M phosphate buffered saline at pH 7.5 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl (PBS); 0.05 M MES buffer at pH 5.0; 0.05 M phosphate buffer at pH 6.0 (PB); 0.1 M Tris-HCl buffer at pH 7.2; and PBS containing 0.05% (w/v) Tween 20 (PBST).

### 2.2. Apparatus

All the electrochemical measurements were performed using a PGSTAT302N potentiostat from Autolab. The SPCEs, consisting of a circular 4-mm carbon working electrode, a carbon counter electrode and a Ag pseudo-reference electrode were purchased from DropSens and were used in conjunction with a specific connector (DRP-CAC, Dropsens). A MixMate mixer (Eppendorf) was used for the homogenization and incubation of the solutions and a DynaMag-2 magnet (Invitrogen) for the magnetic separation of the MBs. A homemade poly(methyl methacrylate) (PMMA) dock with an encapsulated neodymium permanent magnet (AimanGZ) was employed to magnetically capture the MBs onto the working electrode surface during the electrochemical measurements.

### 2.3. Procedures

#### 2.3.1. Biofunctionalization of MBs and sandwich immunoassay

An aliquot of HOOC-MBs suspension (12  $\mu$ L) was transferred to a 1.5 mL microtube and washed twice with MES buffer (pH 5.0) for

5 min. The vial was then placed in the magnetic separator for 2 min before removing the supernatant. For the activation of the carboxylic groups of the MBs as well as the corresponding washing steps, the protocol used was the one recommended by the MBs supplier. In brief, a mixture solution containing 100 mM EDC and 100 mM NHS in MES buffer was added to the washed MBs and left to incubate for 35 min. After another two washing steps with MES buffer, the MBs were resuspended in a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  mouse anti-TNF $\alpha$  solution (prepared also in MES pH 5.0) and incubated during 1 h. Once the capture antibodies were immobilized onto the surface of the MBs, another two washing steps with MES buffer were performed before resuspending the anti-TNF $\alpha$ -MBs in a 1 M ethanolamine solution (prepared in PBS and adjusted to pH 8.5 with NaOH) to block the remaining unreacted groups of the activated HOOC-MBs during 1 h. The MBs were subsequently washed with Tris-HCl pH 7.2 buffer and used the same day of preparation to perform the determination or resuspended in 150  $\mu\text{L}$  of PBST pH 7.5 buffer and kept at 4 °C until the day of carrying out the sandwich immunoassay.

In order to carry out the immunoassay, the mouse anti-TNF $\alpha$  biofunctionalized MBs were resuspended in the TNF $\alpha$  standard solutions (prepared in PBST, pH 7.5) and incubated during 1 h. Thereafter, the MBs were washed twice in PBST buffer and then resuspended and incubated during 1 h in a  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  biotin-anti-TNF $\alpha$  solution (prepared in PBST pH 7.5). After two more PBST washing steps, the MBs were resuspended in a  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  SAV-HRP solution (prepared also in PBST pH 7.5) and left to incubate for 10 min. After another two washing steps with PBST buffer, the modified MBs were finally resuspended in 150  $\mu\text{L}$  of PB buffer pH 6.0.

The 150  $\mu\text{L}$  suspension of modified MBs was used to carry out three replicates of each sample, so that 4  $\mu\text{L}$  of the initial stock of MBs are effectively used in each measurement. In some experiments where the amount of replicates differs, the MB modification was carried out scaling the solution volumes following the protocol described above.

All incubation and washing steps were carried out using volumes of 75 and 150  $\mu\text{L}$ , respectively, and performed under continuous stirring at 950 rpm and 25 °C.

### 2.3.2. Analysis of spiked serum samples

TNF $\alpha$  was determined in spiked serum samples by using the optimized magnetoimmunoassay with minor modifications. The serum samples were assayed at a final 90% concentration, leaving

the remaining 10% of the sample volume to carry out the spiking with TNF $\alpha$ , 0.5% (w/v) BSA, 2% (v/v) Tween and 1 M NaCl. The sample incubated volume was also increased to 100  $\mu\text{L}$ . Otherwise, the protocol described for the standard solutions above was unaltered. In this point, it is important to remark that the commercial serum was used to evaluate the performance of the methodology in this biological sample and that the recoveries studies were performed by spiking the patient serum sample.

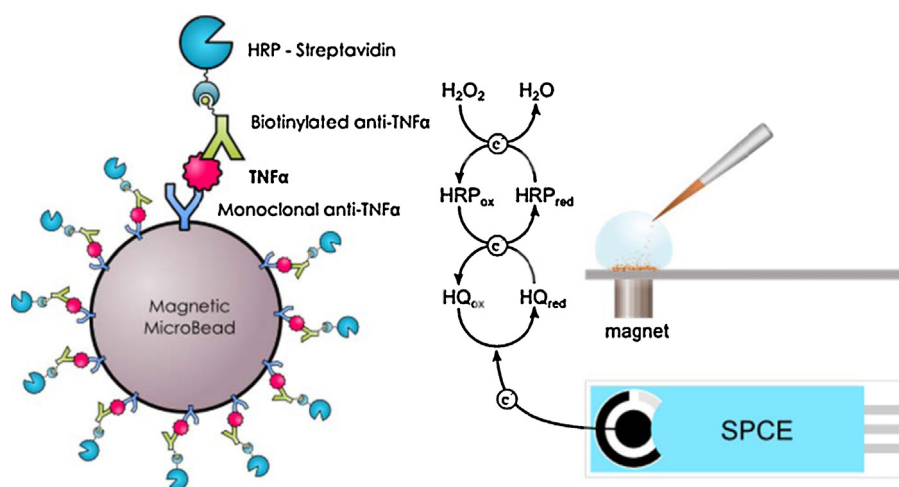
### 2.3.3. Amperometric detection

For the amperometric measurements, the modified MBs were magnetically captured onto the working electrode of the SPCEs. A homemade dock with a magnet matching the size of the working electrode was used to reproducibly concentrate the MBs. A 45  $\mu\text{L}$  drop of the resuspended modified MBs was pipetted on the working electrode of the docked chip for each measurement.

To perform the amperometric measurement, the docked chip (with the modified MBs captured on the working electrode surface) was connected to the potentiostat and immersed into a gently stirred electrochemical cell containing 20 mL of PB pH 6.0 and 1 mM HQ in such way that the three electrodes were completely immersed in the buffer solution. The amperometric signal was monitored by applying a  $-0.20 \text{ V}$  potential (vs. Ag pseudo-reference electrode). After 60 s, 50  $\mu\text{L}$  of a 0.1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution were added into the cell and the current diminution recorded until a steady state was reached. Unless otherwise indicated, the presented data corresponded to the average of at least three replicates. The limits of detection presented were calculated as the concentration corresponding to a signal equal to the triple of the standard deviation of six amperometric signals obtained in the absence of TNF $\alpha$ .

## 3. Results and discussion

The fundamental of the immunosensing configuration and electrochemical determination of TNF $\alpha$  are depicted in Fig. 1. All the immunoreactions were carried out on the surface of the activated HOOC-MBs. The sandwich configuration involved firstly the covalent immobilization of the capture antiTNF $\alpha$  onto MBs using EDC/NHS chemistry and, after a blocking step of the unreacted activated groups of the MBs with ethanolamine, the anti-TNF $\alpha$ -MBs were incubated sequentially in the TNF $\alpha$  standard/sample, biotin-antiTNF $\alpha$  and SAV-HRP solutions according to the protocols described in detail in Section 2.



**Fig. 1.** Schematic display of the sandwich TNF $\alpha$  magnetoimmunoassay developed. The electrodic and enzymatic reactions involved in the amperometric detection of the enzymatic reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  with HRP mediated by HQ at the SPCE are also shown.

### 3.1. Optimization of experimental variables

With the aim of achieving an optimum magnetoimmunoassay performance, an exhaustive evaluation of the non-specific adsorptions and the optimization of all the variables involved in the described protocol were carried out.

The possible existence of non-specific binding (NSB) of the antigen, detection antibody or enzymatic label onto the functionalized MBs surface was evaluated by comparing the amperometric signals obtained for 0 and 500 ng mL<sup>-1</sup> TNF $\alpha$  with specifically vs. non-specifically-functionalized MBs. Two types of modified MBs were used for this purpose: unmodified MBs (the activation and blocking steps were carried out but no antibody was immobilized on their surface); and MBs modified with antibody: specific (antiTNF $\alpha$ ) vs. non-specific (MlgG) for TNF $\alpha$ . The signal-to-noise (S/N) ratio of the assays performed either in the absence of capture antibody or in the presence of a non-specific one were 13 times lower than those obtained with the antiTNF $\alpha$ -MBs (data not shown). This demonstrated the low non-specific adsorption of antigen, detector antibody or enzymatic label on HOOC-MBs without capture antibody immobilized.

Unless otherwise stated, all the experimental variables involved in the magnetoimmunoassay functioning were optimized by taking as the selection criterion the ratio between the current values measured at  $-0.20$  V (vs. Ag pseudo-reference electrode) in the absence (N) and in the presence (S) of 5 ng mL<sup>-1</sup> TNF $\alpha$  following the protocol described in Section 2. Table 1 collects the ranges tested for all the variables studied, as well as the selected values for each.

As an example of these optimization studies, Fig. 2 shows the results obtained for the optimization of the volume per assay of the HOOC-MBs stock solution (Fig. 2a) and the antiTNF $\alpha$  loading on the activated MBs (Fig. 2b). As it was expected, an increase in the HOOC-MBs loading increased the S/N ratio up to 4  $\mu$ L. Larger quantities provoked a noticeable decrease in the ratio values most likely because of a higher electron transfer resistance occurring for large modified-MBs loadings [18]. Moreover, a worse reproducibility between measurements was observed working with larger volumes; an effect that could stem from the difficulty to uniformly spread and capture in a reproducible way large quantities of MBs on the working electrode. Taking these observations into account, a volume of 4  $\mu$ L of the initial MBs solution per assay was selected as optimal.

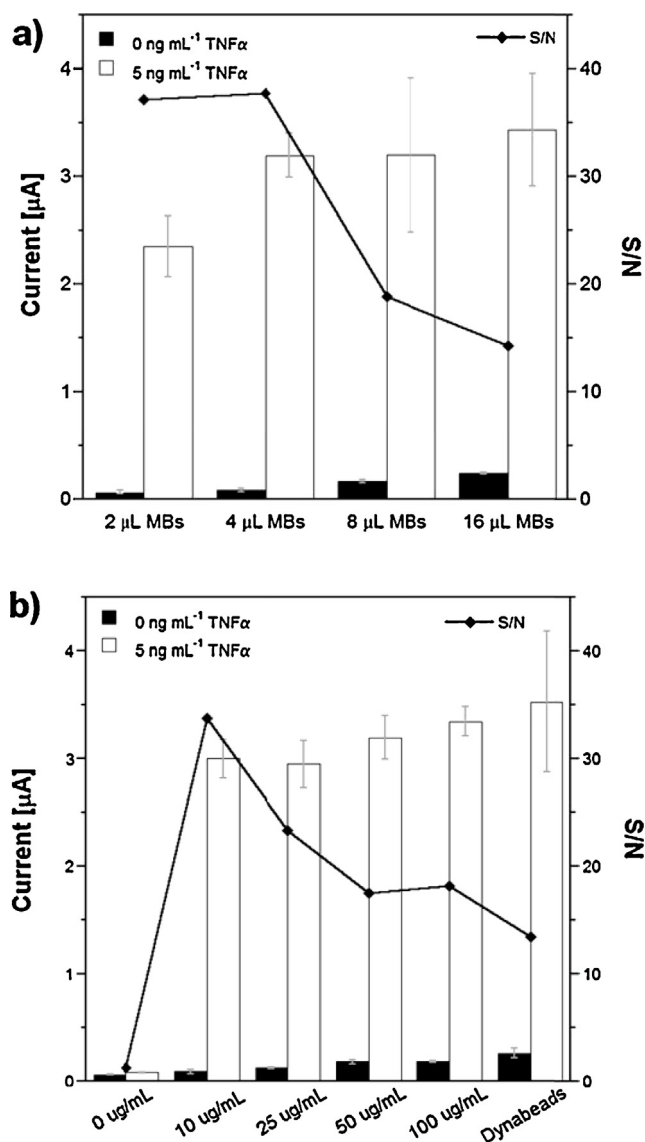
On the other hand, the optimization of the antiTNF $\alpha$  concentration was carried out in the range of 10–100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> the S/N ratio increased with the antiTNF $\alpha$  concentration reaching a maximum value at 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> and showing a slight decrease for higher loadings, which can be attributed to the sterically hindered binding of the antigen when high concentrations of capture antibody were immobilized. Accordingly, 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of antiTNF $\alpha$  were chosen for further studies, which represent a 10-fold reduction in the primary antibody quantity than that recommended in the manufacturer protocol for ELISA assay representing an important advantage in the final cost-per-assay.

Concentrations of the biotinylated-antiTNF $\alpha$  and the SAV-HRP conjugate were also optimized in the 0.5–8.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> range (data

not shown). The S/N ratio increased with the detector antibody concentration up to 2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, leveling off above this value. According to the SAV-HRP concentration, the highest S/N ratio was obtained using a concentration of 0.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

### 3.2. Analytical characteristics

Under the optimized experimental conditions, a calibration curve was constructed in PBST pH 7.5 for standard TNF $\alpha$  solutions in the 5 pg mL<sup>-1</sup>–5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> concentration range (Fig. 3). The sigmoidal shape of the calibration plot perfectly fitted with a 1:1 biomolecular binding model. An estimation of  $K_D \sim 600$  pM was obtained by fitting the binding isotherm shown Fig. 3 with a simple affinity model and non-linear regression and calculating the concentration at which 50% of the maximal response was obtained [19]. The low  $K_D$  value obtained, in agreement with a kinetic analysis of the TNF $\alpha$ -antiTNF $\alpha$  interactions reported in [6], indicated the high affinity of such interaction, therefore supporting



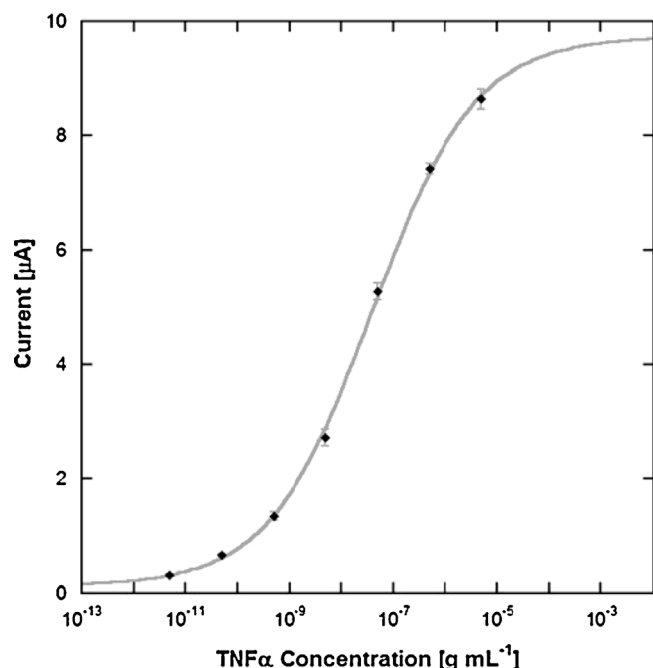
**Fig. 2.** Effect of the MBs loading (a) and antiTNF $\alpha$  concentration (b) on the amperometric responses measured with the sandwich magnetoimmunoassay for 0 and 5 ng mL<sup>-1</sup> TNF $\alpha$  (S/N). For comparison purposes the results obtained with the manufacturer-recommended protocol were also shown. Supporting electrolyte, PB pH 6.0;  $E_{app} = -0.20$  V vs. Ag pseudo-reference electrode. Error bars were calculated as triple of the standard deviation ( $n=3$ ).

**Table 1**

Optimization of the different experimental variables involved in the preparation of the magnetoimmunoassay for TNF $\alpha$ .

Experimental variable	Tested ranges	Selected values
HOOC-MBs stock solution volume, $\mu$ L	2–16	4
(antiTNF $\alpha$ ), $\mu$ g mL <sup>-1</sup>	10–100	10
(Biotin-antiTNF $\alpha$ ), $\mu$ g mL <sup>-1</sup>	0.5–8	2
(SAV-HRP), $\mu$ g mL <sup>-1</sup>	0.5–8	2
SAV-HRP incubation time, min	10–60	10





**Fig. 3.** Calibration curve constructed for TNF $\alpha$  standards prepared in PBST pH 7.5. Supporting electrolyte, PB pH 6.0;  $E_{app} = -0.20$  V vs. Ag pseudo-reference electrode. Other optimal conditions described in Table 1. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

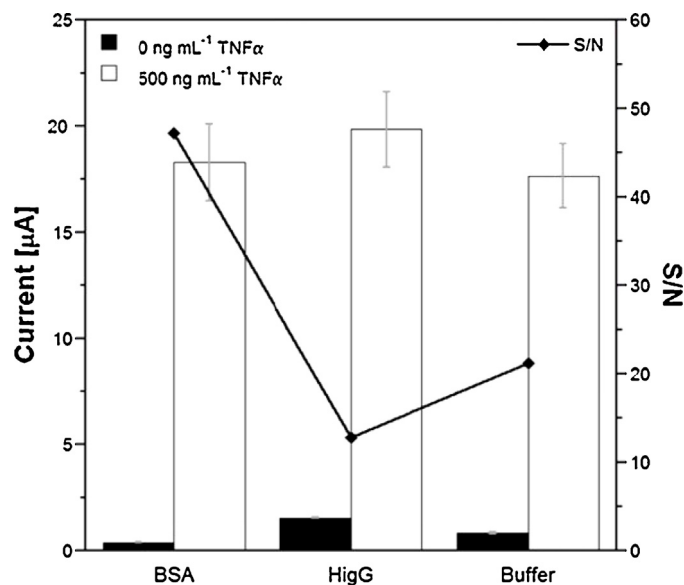
the high sensitivity found with the magnetoimmunoassay. A LOD of  $2.0 \text{ pg mL}^{-1}$  ( $0.15 \text{ pg}$  in  $75 \text{ }\mu\text{L}$  or  $36 \text{ fM}$ ) was estimated, a value which lies well in the clinically relevant concentration range.

The reproducibility of the responses obtained with different magnetoimmunoassays prepared in the same manner was evaluated both within the same day and between different days by performing measurements in the presence of  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  of TNF $\alpha$ . Results for 5 different magnetoimmunoassays prepared on the same day yielded a RSD value of 5.7%, whilst the RSD value was 7.5% for 10 amperometric responses measured within different days. These results demonstrated that the whole procedure involving the magnetoimmunoassay fabrication (MBs modification and magnetic capture on the SPCE surface) and the corresponding amperometric measurement were reliable and that reproducible amperometric responses could be obtained with different magnetoimmunoassays performed in the same manner.

Taking into account that the developed methodology involves performing the immunoreactions on the MBs and not on the electrode surface, the possibility of storing the antiTNF $\alpha$ -MBs after capture antibody immobilization was evaluated. This procedure would allow carrying the modified MBs to the place where samples should be taken to capture the target protein *in situ*. The storage stability of the antiTNF $\alpha$ -MBs in PBST buffer at  $4^\circ\text{C}$  was also studied by comparing the amperometric responses for assaying  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  TNF $\alpha$  standard solutions. The results demonstrated that no significant decrease in the S/N ratio was observed after 2 weeks of storage, indicating a high stability of the antibody-modified MBs which can be prepared and stored until the determination needs to be made. This would make the whole assay time shorter.

### 3.3. Selectivity of the developed immunosensor

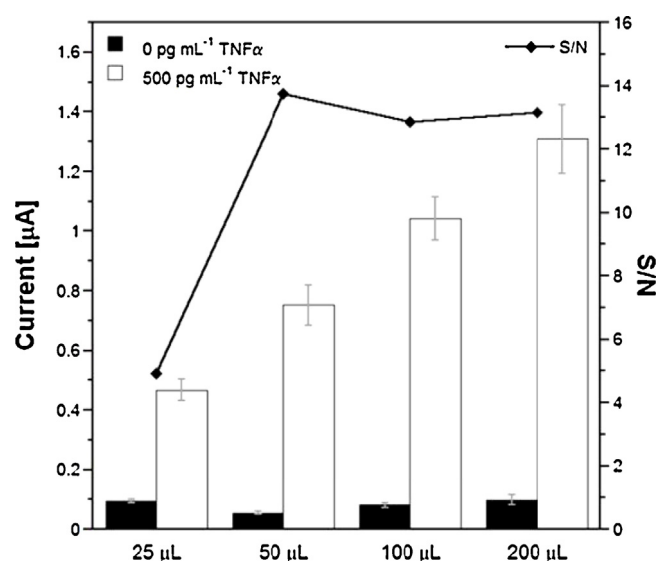
To evaluate the selectivity of the immunosensor, the effect of the presence of two non-target proteins highly concentrated in serum samples ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA, and  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  HlgG) was evaluated. These tests were performed by comparing the current values at stationary state measured with the



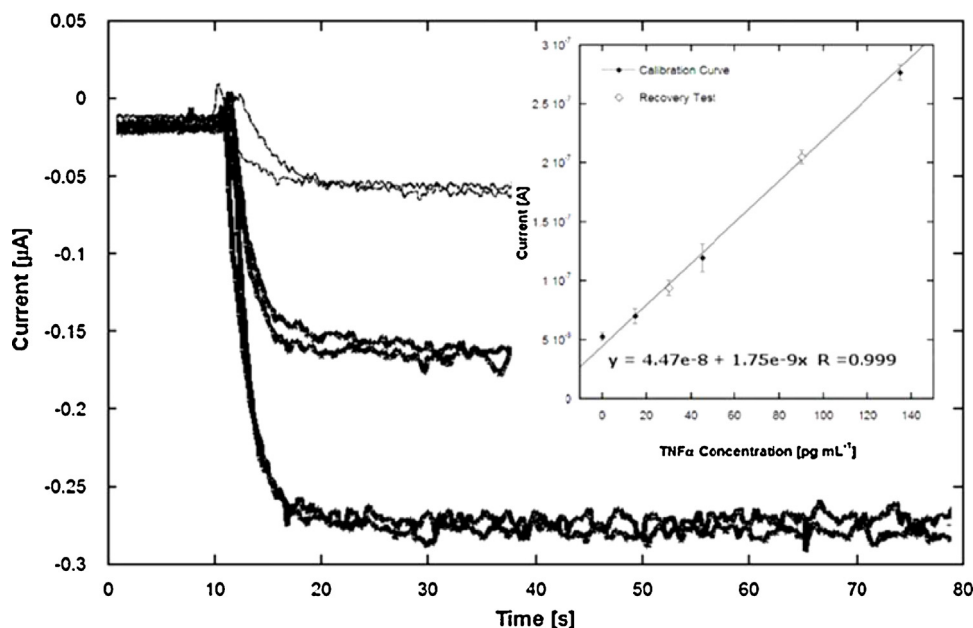
**Fig. 4.** Selectivity achieved with the sandwich magnetoimmunoassay. Current values measured for 0 and  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  TNF $\alpha$  in the absence (1) or in the presence of  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA (2), and  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  HlgG (6). Other experimental conditions as in Fig. 3. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

magnetoimmunoassay for 0 and  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  TNF $\alpha$  in the absence and in the presence of each non-target protein. Fig. 4 clearly shows that the presence of these two proteins did not represent a significant interference in the TNF $\alpha$  determination. Indeed it is worth to mention the positive blocking effect of BSA (revealed by a 2-fold lower signal obtained in the absence of TNF $\alpha$ ) pointing out its possible use as carrier-protein and blocker in the assay to increase the final S/N.

The great selectivity achieved can be attributed to the use of two specific antibodies in the design of the sandwich magnetoimmunoassay and their high affinity for the target protein as demonstrated by the low  $K_D$  value, which drastically reduce the possibility of false negative results thus offering a secure diagnostic to the user.



**Fig. 5.** Effect of the sample incubation volume on the amperometric responses measured with the sandwich magnetoimmunoassay for human serum samples spiked with 0 and  $500 \text{ pg mL}^{-1}$  TNF $\alpha$  (S/N). Supporting electrolyte, PB pH 6.0;  $E_{app} = -0.20$  V vs. Ag pseudo-reference electrode. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).



**Fig. 6.** Chronoamperometric traces recorded with the magnetoimmunosensor for 90% human serum samples spiked with 0, 45 and 135 pg mL<sup>-1</sup> TNFα. Inset: calibration curve for TNFα constructed in 90% human serum. Experimental conditions are described in Table 1. Error bars were estimated as a triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

Therefore, the obtained results are promising and encouraging for the further application of the developed amperometric magnetoimmunoassay to the determination of TNFα in serum samples.

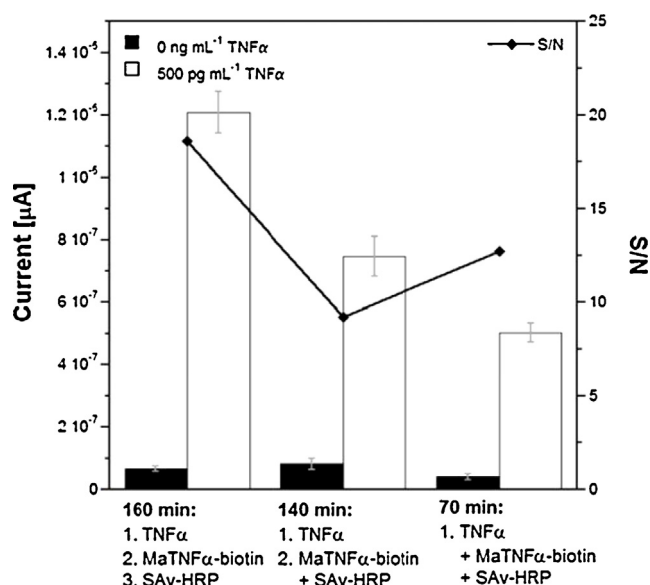
### 3.4. Application to the analysis of human serum samples

The usefulness of the amperometric sandwich magnetoimmunoassay for the analysis of human serum was evaluated by constructing a calibration plot using undiluted commercial human serum samples spiked with different levels of the target protein. According to the results obtained (data not shown) a LOD of 43 pg mL<sup>-1</sup> was estimated which is an order of magnitude larger than the one obtained in standard solutions and higher than the low cut-off levels (lower than 10 pg mL<sup>-1</sup>) established for relevant illnesses [2,20–22]. In order to improve the sensitivity in the analysis of serum samples and expand the potential clinical applications of the developed magnetoimmunoassay, a special optimization of the immunoassay was carried out in order to achieve the required sensitivity in serum.

Firstly, the performance of the sandwich magnetoimmunoassay using a specially prepared cocktail solution containing 1 M NaCl and 2% Tween 20 to hinder ionic and hydrophobic interactions, respectively, supplemented also with 0.5% BSA to further enhance the blocking effect (according to the results shown in Fig. 4) was evaluated. Working with this solution, the blank signal was reduced by half without any detrimental effect on the positive signal (data not shown). Additionally, other common approaches, consisting on reducing the serum concentration down to 30% or filtering the sample through a 100 kDa cut-off centrifugal filter, were evaluated but did not improve the S/N.

Another factor that can have a decisive influence on the LOD is the sample volume used. To study its influence, the S/N obtained for non-spiked and 500 pg mL<sup>-1</sup> TNFα spiked serum samples varying the sample incubation volume from 25 to 200 μL were compared. As can be seen in Fig. 5, in all the tested volume range, the signal increased with the incubation volume and no apparent negative effects were observed in the blank signals. Since real patient samples are in fact very valuable a compromise had to be taken. For this reason, a sample volume of 100 μL, typically used in ELISA tests, was chosen.

Using these conditions, a calibration plot for TNFα in 90% human serum was constructed by spiking these samples with TNFα concentrations ranging from 0 to 400 pg mL<sup>-1</sup> corresponding to the lower linear section of the graph shown in Fig. 3. The experimental points together with the excellent linear regression are shown in Fig. 6. The corresponding LOD was established at 5.8 pg mL<sup>-1</sup> (0.58 pg in 100 μL of sample or 105 fM) which taking into account that the sample is almost not diluted, allows the determination of TNFα at concentration levels of the lowest cut-off established for this biomarker. It is important to highlight that the achieved LOD is 8 times lower than that obtained with the only electrochemical magnetobioassay reported previously [17]. Moreover, this magnetobioassay exhibited a significant matrix effect in



**Fig. 7.** Effect of the number of steps used to perform the sandwich magnetoimmunoassay on the amperometric responses obtained for 1 and 500 pg TNFα (S/N). Supporting electrolyte, PB, pH 6.0;  $E_{app} = -0.20$  V vs. Ag pseudo-reference electrode. Other conditions described in Section 2. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

**Table 2**Analytical characteristics for different electrochemical TNF $\alpha$  immunosensors reported in the literature.

Methodology	Technique	Sample	Concentration Range (pg mL <sup>-1</sup> )	LOD (pg mL <sup>-1</sup> )	Assay time	Reference
Gold nanoparticle signal amplification	SPR	25% human serum	50–300	54.4	20 min	[6]
Enhanced chemiluminescence	ECL	50% calf serum	9–312	1	~15 h	[7]
Methylene blue labeled aptamers	EC (SWV)	Whole human blood	10,000–100,000	10,000	~1 h	[8]
Ferrocene modified self-assembled peptide nanowire and glucose oxidase functionalized gold nanorod	EC (SWV)	Human serum	10–10,000	2	~3 h	[9]
Label-free	EIS	Culture media	1–100	1	~3 h	[23]
Label-free	EC (CV)	Human serum	20–34,000	10	~5 h	[10]
Ceria nanoparticles	EC (CA)	Human serum	5–5000	2	~4 h	[11]
MBs	EC (DPV)	Serum mimic	100–5000	44	~6 h	[17]
Alkaline phosphatase functionalized nanospheres	EC	Serum	20–200,000	10	~3 h	[24]
Magnetoimmunoassay	EC (CA)	Human serum	15–405	5.8	1–3 h	This work

serum samples with responses approximately 30 times lower than those measured in standard solutions. The improved analytical performance of our magnetoimmunoassay is attributable to the use of HOOC-MBs, appropriately blocked with ethanolamine after capture antibody immobilization and the careful re-optimization of the magnetoimmunoassay carried out in the sample matrix including the use of the special cocktail solution to perform the determination.

The determination of TNF $\alpha$  was carried out in serum from a patient with a non-detectable TNF $\alpha$  content which was spiked at two different concentration levels: 30 and 90 pg mL<sup>-1</sup>. Quantification was accomplished by interpolation of the measured current values into the calibration plot shown in Fig. 6. The analysis of these samples ( $n=3$ ) yielded mean contents of  $(28 \pm 4)$  and  $(91 \pm 3)$  pg mL<sup>-1</sup>, respectively, corresponding to recoveries of  $(94 \pm 11)$  and  $(102 \pm 10)\%$ , respectively. These results demonstrated the usefulness of the developed magnetoimmunoassay for the direct TNF $\alpha$  determination in real human serum despite the complexity of these biological samples.

Moreover, it should be mentioned that the developed methodology allows unequivocal detection of raised levels of TNF $\alpha$  and quantification of the target protein in a total assay time of 160 min (if the antiTNF $\alpha$ -MBs are previously prepared for routine analysis).

It should be mentioned that the assaying time could be significantly reduced, always at the expense of slightly increased LODs. For example, Fig. 7 shows the results obtained in the analysis of human serum using two different approaches to reduce the number of incubations with the aim of shortening the assay time. On the one hand, merging the biotin-anti-TNF $\alpha$  and SAV-HRP steps in a single incubation step resulted in a 140 min assaying time and a 38% signal reduction (compared to the reference value obtained with the optimized immunoassay performed in 3 separate steps). On the other hand, when using a more direct approach, where the spiked sample was supplemented with both the biotin-anti-TNF $\alpha$  and the SAV-HRP and incubated during 60 min with the modified MBs, the positive signal was reduced around 59%. For applications where extremely low LODs are not required or large sample volumes were available, these approaches, significantly less time-consuming, would be useful.

The TNF $\alpha$  magnetoimmunoassay described was compared with other approaches reported in the literature applied to the TNF $\alpha$  detection in complex matrices (see Table 2). Although most of the assays described dealt with electrochemical measurements and very low LODs (see, e.g. [9,11]), a thorough characterization of their performance in serum was not carried out and only recovery tests performed at higher concentration values were briefly-discussed. It is important to emphasize also that the simplicity and short assay time as well as the potential for automation, miniaturization and portability of the presented approach compares advantageously with other reports.

## 4. Conclusions

An amperometric magnetoimmunoassay for the detection of TNF $\alpha$  protein using disposable SPCEs and specifically functionalized MBs was developed. After optimization, the analytical performance of the sandwich magnetoassay was excellent and very low LODs of 2.0 pg mL<sup>-1</sup> (36 fM) and 5.8 pg mL<sup>-1</sup> (105 fM) were obtained for standard solutions and spiked human serum samples, respectively. These values lay well in the clinically relevant range and elevated TNF $\alpha$  biomarker levels could be detected. The robustness of the detection was proved by performing successful recovery tests directly in human serum samples without pretreatment or diluting the sample. It is worth mentioning that the methodology developed for this highly sensitive TNF $\alpha$  immunoassay, based on the use of HOOC-MBs, an exhaustive reoptimization of the magnetoimmunoassay carried out in the matrix sample and the use of a special blocking solution, could be extended to other protein biomarkers present at low concentrations in serum given that high-affinity antibodies are available. The simplicity, short assay time and great performance makes this magnetoimmunoassay a very attractive alternative to commonly used ELISAs for the development of automated point-of-care systems for TNF $\alpha$ .

## Acknowledgements

This work was supported by Gobierno Vasco, Dpto. Industria, Innovación, Comercio y Turismo under the Etorrek 2013 Grant No. IE13–360, the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects, CTQ2012–34238, CTQ2011–24355 and the AVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642). U. Eletxigerra acknowledges Fundación Centros Tecnológicos Iñaki Goenaga for a PhD. grant. R. Villalonga acknowledges the Ramón & Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

## References

- [1] B.B. Aggarwal, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 745–756.
- [2] S. de Kossodo, V. Houba, G.E. Grau, Assaying tumor necrosis factor concentrations in human serum. A WHO International Collaborative study, *J. Immunol. Methods* 182 (1995) 107–114.
- [3] J. Martínez-Borra, C. López-Larrea, S. González, D. Fuentes, A. Dieguez, E.M. Deschamps, et al., High serum tumor necrosis factor-alpha levels are associated with lack of response to infliximab in fistulizing Crohn's disease, *Am. J. Gastroenterol.* 97 (2002) 2350–2356.
- [4] I. Ordás, B.G. Feagan, W.J. Sandborn, Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor antagonists in inflammatory bowel disease, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (2012) 1079–1087 quiz e85–e86.
- [5] D. Derin, H.O. Soydicin, N. Guney, F. Tas, H. Camlica, D. Duranyildiz, et al., Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF-alpha in nonsmall cell lung cancer, *Lung Cancer* 59 (2008) 240–245.

- [6] J. Martínez-Perdiguero, A. Retolaza, L. Bujanda, S. Merino, Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF $\alpha$  biomarker in human serum, *Talanta* 119 (2014) 492–497.
- [7] L. Luo, Z. Zhang, L. Ma, Determination of recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  in serum by chemiluminescence imaging, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 277–282.
- [8] Y. Liu, Q. Zhou, A. Revzin, An aptasensor for electrochemical detection of tumor necrosis factor in human blood, *Analyst* 138 (2013) 4321–4326.
- [9] Z. Sun, L. Deng, H. Gan, R. Shen, M. Yang, Y. Zhang, Sensitive immunosensor for tumor necrosis factor  $\alpha$  based on dual signal amplification of ferrocene modified self-assembled peptide nanowire and glucose oxidase functionalized gold nanorod, *Biosens. Bioelectron.* 39 (2013) 215–219.
- [10] S. Weng, M. Chen, C. Zhao, A. Liu, L. Lin, Q. Liu, et al., Label-free electrochemical immunosensor based on K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] as signal for facile and sensitive determination of tumor necrosis factor- $\alpha$ , *Sens. Actuators B-Chem.* 184 (2013) 1–7.
- [11] T. Li, Z. Si, L. Hu, H. Qi, M. Yang, Prussian Blue-functionalized ceria nanoparticles as label for ultrasensitive detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ , *Sens. Actuator B-Chem.* 171–172 (2012) 1060–1065.
- [12] E. Palecek, M. Fojta, Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing, *Talanta* 74 (2007) 276–290.
- [13] L. Chen, L. Deng, L. Liu, Z. Peng, Immunomagnetic separation and MS/SPR end-detection combined procedure for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and protein A, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1487–1492.
- [14] S. Centi, S. Laschi, M. Mascini, Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads, *Talanta* 73 (2007) 394–399.
- [15] M. Gamella, S. Campuzano, F. Conzuelo, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Amperometric magnetosensors for direct determination of d-dimer in human serum, *Electroanalysis* 24 (2012) 2235–2243.
- [16] S. Campuzano, V. Salema, M. Moreno-Guzmán, M. Gamella, P. Yáñez-Sedeño, L. a Fernández, et al., Disposable amperometric magnetosensors using nanobodies as biorecognition element. Determination of fibrinogen in plasma, *Biosens. Bioelectron.* 52 (2014) 255–260.
- [17] F. Bettazzi, L. Enayati, I. Campos, Electrochemical bioassay for the detection of TNF- $\alpha$  using magnetic beads and disposable screen-printed array of electrodes, *Bioanalysis* 5 (2013) 11–19.
- [18] O. Loaiza, S. Campuzano, M. Pedrero, M.I. Pividori, P. García, J.M. Pingarrón, Disposable magnetic DNA sensors for the determination at the attomolar level of a specific enterobacteriaceae family gene, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8239–8245.
- [19] M.A. Cooper, *Label-Free Biosensors: Techniques and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, 2009.
- [20] G. Borrayo, G. Careaga, C.J. Muro, A. Autrey, P. Pérez, R. Yáñez, et al., Assessment of right ventricular function using contrast echocardiography in patients with myocardial infarction, *Revista Española De Cardiología* 56 (2) (2014) 175–180 (English version).
- [21] E. Papadopoulou, G. Tripsianis, K. Anagnostopoulos, I. Tentis, S. Kakolyris, G. Galazios, et al., Significance of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  and its combination with HER-2 codon 655 polymorphism in the diagnosis and prognosis of breast cancer, *Int. J. Biol. Marker* (2010) 126–135.
- [22] M. Correia, M. Cravo, P. Marques-Vidal, R. Grimble, A. Dias-Pereira, S. Faia, et al., Serum concentrations of TNF- $\alpha$  as a surrogate marker for malnutrition and worse quality of life in patients with gastric cancer, *Clin. Nutr.* 26 (2007) 728–735.
- [23] T.S. Pui, P. Kongsuphol, S.K. Arya, T. Bansal, Detection of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in cell culture medium with label free electrochemical impedance spectroscopy, *Sens. Actuators B-Chem.* 181 (2013) 494–500.
- [24] Z. Yin, Y. Liu, L.-P. Jiang, J.-J. Zhu, Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor  $\alpha$  based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 1890–1894.





# Disposable microfluidic immuno-biochip for rapid electrochemical detection of tumor necrosis factor alpha biomarker



U. Eletxigerra<sup>a,b</sup>, J. Martinez-Perdiguerro<sup>a,b,\*</sup>, S. Merino<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Micro-NanoFabrication Unit, IK4-Tekniker, Eibar, Spain

<sup>b</sup> CIC microGUNE, Arrasate-Mondragón, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 28 May 2015

Received in revised form 24 July 2015

Accepted 7 August 2015

Available online 10 August 2015

### Keywords:

Electrochemical detection

Tumor necrosis factor alpha

Disposable biochip

## ABSTRACT

This paper presents a disposable microfluidic electrochemical immunosensor for rapid, cheap and quantitative detection of biomarkers. Dual screen-printed carbon electrodes were biofunctionalized with specific antibodies and subsequently encapsulated with an all-disposable polymeric microfluidic cell. The electrochemical detection was carried out by means of differential pulse voltammetry (DPV) using a portable potentiostat. One of the two working electrodes was employed as an on-chip integrated negative control. The system was optimized and characterized for the detection of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), an important inflammation biomarker, with a limit of detection (LOD) of 4.1 ng/mL. Successful experiments in real human serum were also carried out.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The development of cheap and fully disposable lab-on-a-chip devices for specific protein immunosensing is highly desirable because of their wide application spectrum in clinical diagnosis [1], as well as in environmental [2] and food analysis [3]. Among the many protein quantification methods, electrochemical techniques stand out due to high sensitivity, fast analysis, low cost, multiplexing possibilities and potential miniaturization [4]. The use of screen printed electrodes (SPEs) is especially interesting from the application point of view due to their mass-production possibilities with high inter-batch reproducibility at a very low cost [5]. The combination of the sensing parts with microfluidics is also attractive because it offers direct control over low sample volumes and potential integration of preparation steps. Low-cost disposable polymeric microfluidics are especially desirable when working with real clinical samples because cumbersome cleaning protocols and cross-contamination are avoided.

Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) is a widely-studied pleiotropic cytokine with a central role in many immune and inflammatory processes. This important multifunctional protein biomarker is involved in several high-incidence high-impact diseases such as inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis and

many other inflammatory processes including cancer [6]. Interestingly, several biological drugs acting as TNF $\alpha$  activity blockers have proved their effectiveness [7]. Elevated levels of TNF $\alpha$  in serum are found in patients suffering some kind of the above-mentioned diseases (see, e.g., [7–9]).

The gold standard for TNF $\alpha$  assaying, as for many other protein biomarkers, is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, for a long time, the disadvantages of this method (e.g., long assaying times, large sample volumes or the necessity of expensive equipment and trained personnel) have motivated research on a wide variety of different formats such as optical [10–12], acoustic [13] or electrochemical biosensors [14–19] which also present potential for integration and miniaturization.

In previous papers, we have reported highly-sensitive TNF $\alpha$  biosensors based on surface plasmon resonance [10] and amperometric magnetosorbent assay [14] demonstrating several advantages over the conventional ELISA. However, more research must be carried out towards reducing the inherent complexity of the assays (including laborious protocols, use of expensive and critical instrumentation, long incubation times, etc.). As a result, the development of rapid, simple and sensitive methods for biomarker detection has become crucial for their use in real clinical applications. A cost-effective and disposable lab-on-a-chip can incorporate all this characteristics in a single device which is considered the best contender technology for this task [20].

In this paper we report the development of a simple and fully disposable lab-on-a-chip for electrochemical detection of TNF $\alpha$ . The low-cost chips integrate specifically modified electrodes for

\* Corresponding author at: Micro-NanoFabrication Unit, IK4-Tekniker, Eibar, Spain.

E-mail address: [josu.martinez@tekniker.es](mailto:josu.martinez@tekniker.es) (J. Martinez-Perdiguerro).

signal transduction and polymeric fluidics for sample control. The specificity, limit of detection (LOD) and linear range of the immunoassay have been characterized and TNF $\alpha$  in 25% spiked human serum samples has been successfully quantified.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

For the experiments, recombinant human TNF $\alpha$  protein, monoclonal mouse anti-human TNF- $\alpha$  (anti-TNF $\alpha$ ) as capture antibody and biotinylated polyclonal rabbit anti-TNF $\alpha$  (biotin-anti-TNF $\alpha$ ) as detector antibody were purchased from PeproTech (Refs. AF-300-01A, 500-M26 and 500-P31ABT, respectively). Mouse immunoglobulin G (M-IgG), bovine serum albumin (BSA) and streptavidin conjugated alkaline phosphatase enzymatic label (SAv-AP) were from Jackson Immuno Research (Refs. 015-000-003, 001-000-161 and 016-050-084 respectively). Human serum from human male AB plasma was purchased from Sigma-Aldrich (Ref. H4522).

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N0-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), ethanolamine hydrochloride (ETA), 1-naphthyl phosphate (1-NP), absolute ethanol and lithium perchlorate (LiClO<sub>4</sub>) were from Sigma-Aldrich. Sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), diethanolamine (DEA), magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) and 4-Aminobenzoic acid (4-ABA) were purchased from Scharlau. All other chemicals were of analytical grade and ultrapure water (Millipore Milli-Q) was used for all solutions and buffers.

The buffers and solutions employed in this work were: 0.01 M phosphate buffered saline at pH 7.5 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl (PBS); 0.05 M MES buffer at pH 5.0; 0.1 M Tris-HCl buffer at pH 7.2; 0.1 M diethanolamine solution at pH 9.8 containing 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 M KCl (DEA); 3 mM 4-ABA and 0.1 M LiClO<sub>4</sub> ethanol solution.

The electrochemical measurements were performed using a portable  $\mu$ STAT 400 portable bipotentiostat/galvanostat from Dropsens (Spain). Disposable dual screen-printed carbon electrodes (SPCEs) with two elliptic 6 mm<sup>2</sup> carbon working electrodes, a carbon counter electrode and a silver pseudo-reference electrode (Dropsens, ref. DRP-1110) were used.

### 2.2. Biochip functionalization

Two different surface functionalization protocols were employed on the carbon working electrodes. Firstly, a covalent binding of the capture antibodies by means of amine coupling via a modification of the SPCE surface with 4-ABA was employed. To attach the carboxylic acid groups on the electrode surface, a film of 4-ABA was formed on the working electrode by immersing the SPCE in the 4-ABA solution and performing three consecutive cyclic voltammograms between 0 and 1 V, at 10 mV/s. Afterwards, the -HOOC groups in the formed 4-ABA layer were activated dispensing a 2  $\mu$ L drop of a mixture solution containing 100 mM EDC and 100 mM NHS in MES buffer over each working electrode. The drop was left to incubate for 30 min in a humid chamber, rinsed with Milli-Q water and dried with N<sub>2</sub>. A 2  $\mu$ L drop of the capture anti-TNF $\alpha$  antibody or reference M-IgG antibody at 10  $\mu$ g/mL in MES buffer was placed on the working electrode surface and left to incubate for 1 h in a humid chamber, followed by a rinsing and drying step. Unreacted -HOOC groups were deactivated by incubating a 5  $\mu$ L drop of a 1 M ETA solution during 1 h. The chip surface was rinsed and dried before the final blocking step,

performed by incubating 5  $\mu$ L of a 10 mg/mL BSA solution during 1 h.

Secondly, another immobilization approach was tested by means of straight physical adsorption of the capture antibodies to the electrode surface. A 2  $\mu$ L drop of a 10  $\mu$ g/mL antibody solution was left to dry over the working electrode at 21 °C (45% humidity). After this process finished (ca. 2 h) the surface was washed and blocked with BSA as explained above.

### 2.3. Fluidics integration

Once the electrode surface had been modified, a fluidic integration was carried out following the design shown in Fig. 1. Due to the simple assay format, a straightforward inlet-cell-outlet design was constructed using 80  $\mu$ m-thick double-sided pressure sensitive adhesive (PSA, ARcare 90445, Applied Research), transparency film (CG3420, 3M) and home-made syringe ports [21]. Briefly described, the PSA sheet was cut as shown in Fig. 1 with a precision craft cutter, adhered to the chip ceramic surface and sealed with a perforated film. The two syringe ports were also carefully integrated using PSA as well. The transparent fluidic cell covered all electrodes with a final volume of 8  $\mu$ L where all reagents were easily loaded into the cell via 1 mL syringes. The outlet port was connected to a waste container consisting of a syringe barrel with no plunger.

### 2.4. Electrochemical immunoassay

To perform the single-step electrochemical quantification of TNF $\alpha$ , 100  $\mu$ L of sample were added to a previously prepared 100  $\mu$ L mixture of 4  $\mu$ g/mL biotinylated anti-TNF $\alpha$  and 2  $\mu$ g/mL SAv-AP solution which effectively acted as a labeled secondary antibody. This mixture was introduced by means of a syringe through the inlet port and left to incubate for 1 h at room temperature. For the step-by-step protocol, the sample was firstly injected into the chip and left to incubate for 1 h. After PBS washing, another 1 h-long incubation was carried out with biotinylated antibody (4  $\mu$ g/mL). Finally, after another washing step, SAv-AP (2  $\mu$ g/mL) was introduced and left to incubate for 10 min.

In both cases, the microfluidic cell was subsequently rinsed and renewed with 100  $\mu$ L of 1 mg/mL 1-NP in DEA pH 9.6. After a 2 min long incubation, the electrochemical signal was recorded. The measurement consisted in a differential pulse voltammetry (DPV) method with the following parameters: 70 mV pulse amplitude, 100 ms period and 5 mV steps between 0 and 600 mV at a 10 mV/s sweep rate. All measurements were configured and registered using the Dropview 8400 software.

## 3. Results and discussion

Fig. 2 describes the developed electrochemical TNF $\alpha$  immunoassay showing both the specifically functionalized and reference electrodes. As explained in Sections 2.2 and 2.4, a sandwich immunoassay was formed with a reporter AP molecule on top. This enzyme catalyzes the dephosphorylation of 1-naphthyl phosphate producing 1-naphthol that can be oxidized at the carbon-base electrodes [22]. The 1-NP hydrolysis reaction was left to progress in an alkaline environment (pH of 9.6) and then the DPV response was registered. A 1 mg/mL 1-NP concentration was chosen to ensure the dependence of the product quantity on the enzyme concentration [23].

### 3.1. Optimization of experimental variables

A thorough optimization of the most important aspects of the immunosensor was carried out to ensure good performance. Since the objective was set on rapid TNF $\alpha$  quantification in real human

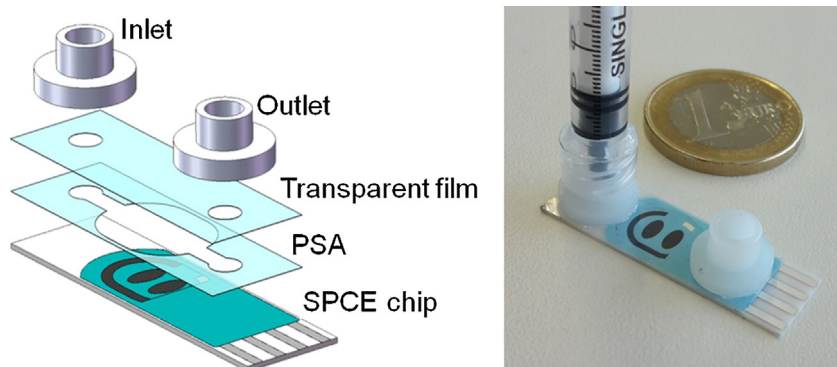


Fig. 1. Scheme and image of the fabricated electrochemical biochip.

serum, a special stress was put upon achieving low non-specific signals and minimizing the assaying time. All optimizations were carried out comparing the voltammetric signals measured for positive 100 ng/mL TNF $\alpha$  and negative samples.

One of the most critical aspects of any surface-based immunosensor is the specific biofunctionalization of the chips. The characteristics of this active antibody layer must ensure good binding capacity and low non-specific interactions. In this work, two different approaches were employed for the functionalization of the SPCEs to compare their effectiveness and suitability for the aimed device: covalent binding involving 4-ABA and direct physical adsorption. The first method offers a very stable attachment at the cost of requiring a more complex functionalization protocol. The second one is more attractive from the practical point of view, because of its bold simplicity which translates into lower costs.

On the one hand, 4-ABA was immobilized on the carbon working electrode surface by amine cation radical formation in ethanol solution. By means of voltammetry, the amino group of the 4-ABA was oxidized to its cation radical and immediately grafted onto the carbon surface of the electrode [24]. A covalent carbon-nitrogen

bond was formed, causing a very stable 4-ABA film on the electrode surface. A standard amine coupling strategy was then employed for the antibody covalent immobilization (see Section 2.2). On the other hand, direct antibody superficial physical adsorption was also tested. In this case, the Van der Waals forces giving rise to the physisorption effect result in weaker binding. Despite extremely simple, this functionalization technique has been successfully used previously, especially in applications where the regeneration of the surface is not required (see, e.g., [25]). The comparison of the TNF $\alpha$  capturing capacity and non-specific binding of chips functionalized with the two methods was carried out using positive and blank samples.

Very similar results in terms of sensitivity and reproducibility were obtained with both functionalization strategies (see Fig. S1). Due to the inherent simplicity of the process and disposable nature of the device, the physical adsorption method was used in all following experiments. It is worth mentioning that, for some other cases in which a more stable antibody surface is convenient (e.g., such as long multistep immunoassays or when surface regeneration is necessary), the covalent binding approach could result in

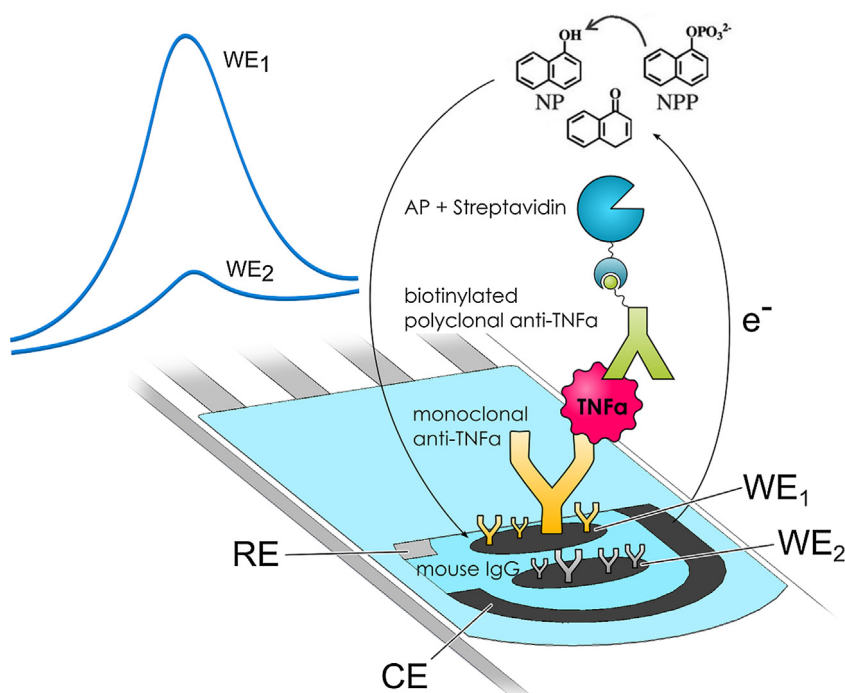
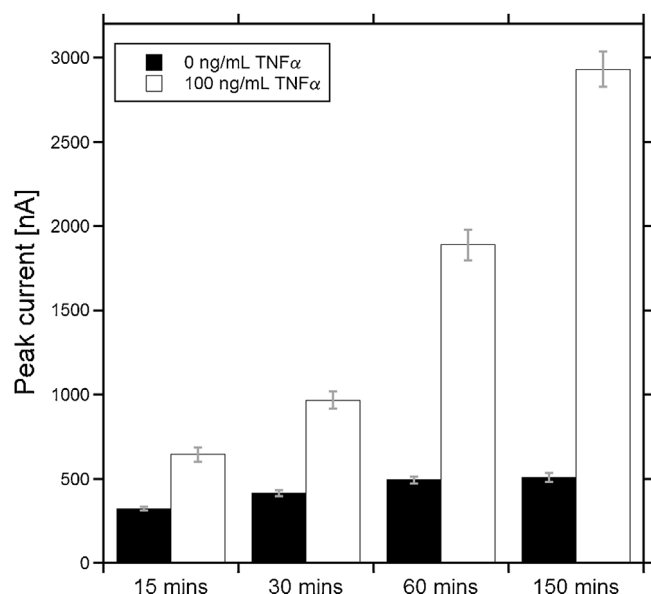


Fig. 2. Schematic display of the developed sandwich TNF $\alpha$  immunoassay. One of the two working electrodes was functionalized with non-specific M-IgG as on-chip integrated control test. CE, WE and RE stand for carbon counter, working and silver pseudo-reference electrodes.



**Fig. 3.** Study of the incubation time signal dependence. The sample biotinylated anti-TNF $\alpha$  and SAV-HRP mixture solution was incubated for 15, 30, 60 and 150 min respectively. Error bars were estimated as triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

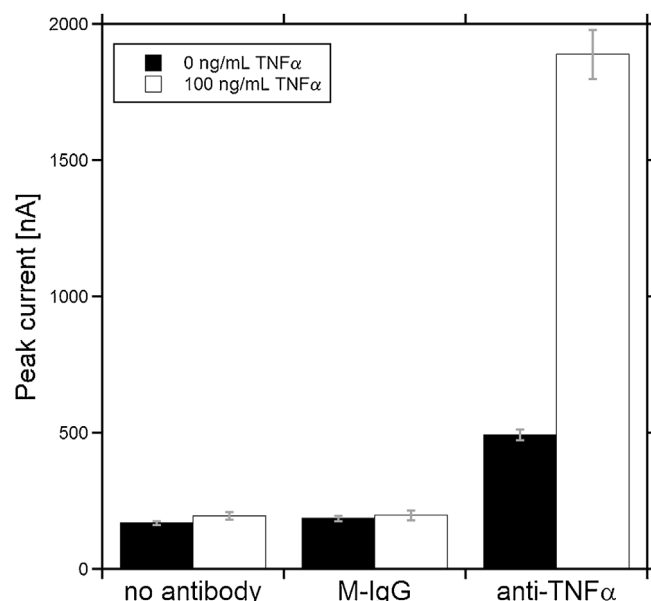
better performance. After the above-described electrode functionalization process, the integration of the fluidics in the chips (see Section 2.3) was carried out. These were stored at 4 °C until use.

In many cases, the complexity of developed assays is due to the necessity of carrying out numerous steps. From the practical point of view, a one-step measurement system is extremely attractive. Nevertheless, the correct formation of the sandwich structure is essential to achieve low detection limits and high specificities. In this work, a comparison between the step-by-step sandwich immunoassay formation and a one-step approach has been carried out. TNF $\alpha$  positive and blank samples were assayed with both methods and a comparison was carried out (see Fig. S2). The one-step approach yielded a signal 22% larger than that obtained with the step-by-step immunoassay. This result could be due to loss of capture antibody during the washing steps or ineffective diffusion to the surface in the three consecutive steps (it has to be taken into account than in the one-step approach part of the immunoassay is more efficiently formed in solution). It was considered that the one-step format greatly simplified and enhanced the applicability of the device.

Since the kinetics of the specific antigen–antibody recognition are fixed by the proteins employed, the incubation time is one of the most important parameters to be tested to optimize the assay performance. As above, its effect was studied by varying the contact times of TNF $\alpha$  positive and blank samples from 15 up to 150 min (see Fig. 3). As it can be seen, even with a 15 min-long incubation, the 100 ng/mL sample gave rise to a clearly measurable signal. Longer incubation times resulted in larger signals roughly following a linear tendency (in the tested time-range). This behavior was interpreted as a mass-transport limited process caused by an analyte low concentration and a great density of surface binding sites. Reaching a compromise between usability and obtained signal, all following experiments were also carried out with 60-min-long sample incubations.

### 3.2. Specificity tests

The specificity is always a key parameter for all sensor platforms to be used with complex real samples such as serum. In this work, the specificity was thoroughly tested by substituting the



**Fig. 4.** Study of the specificity of the immunoassay. The surface of the working electrode was modified either with BSA (non-specific), M-IgG (non-specific) or anti-TNF $\alpha$  (specific). A BSA blocking step was also performed after both antibody modifications as described in Section 2.2. Error bars were estimated as triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

specific primary anti-TNF $\alpha$  antibodies with generic non-specific mouse immunoglobulin antibodies (M-IgG). These antibodies are structurally equal to the mouse monoclonal anti-TNF $\alpha$  capture antibodies except for the antigen binding sites and they represent the best alternative for non-specific binding tests. Measurements with total absence of antibodies on the sensor surface (blocked with BSA) were also carried out. Fig. 4 shows TNF $\alpha$  positive and blank tests for the TNF $\alpha$  specific surface and the two prepared reference surfaces. As it can be clearly seen, the non-specific surfaces did not give rise to remarkable signals when compared to the blank samples. This fact proved the great selectivity of the anti-TNF $\alpha$  antibodies and the non-specific binding resistance of the functionalized electrode surface.

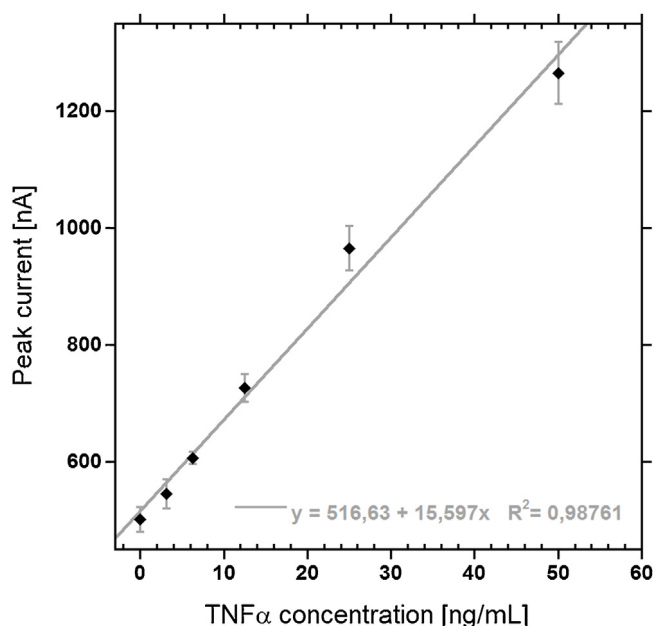
As mentioned in Section 2.2, one of the two available working electrodes in each chip was non-specifically modified with M-IgG and used as an on-chip integrated negative control in each measurement. It is important mentioning that, since the signal stemming from this control could serve as baseline, it allowed for the direct qualitative TNF $\alpha$  detection in a single measurement without the need of carrying out cumbersome calibration curves. This fact could be of great applicability for fast patient screening tests.

### 3.3. Immunosensor performance

Using the optimized detection protocol described above, decreasing concentrations of TNF $\alpha$  spiked buffer samples were measured to obtain a calibration curve. Fig. 5 shows the results for triplicates ( $n = 3$ ) of 2-fold dilutions of TNF $\alpha$  in PBS ranging from 50 ng/mL down to 3.25 ng/mL (including 5 blank samples). A LOD of 4.1 ng/mL and a limit of quantitation (LOQ) of 13.7 ng/mL were calculated as the concentrations corresponding to three and ten times the standard deviation of blank samples ( $n = 5$ ) respectively. As it can be also observed in Fig. 5 linearity is high in the measured concentration range ( $R^2 = 0.987$ ).

Another wider calibration curve was obtained with concentrations up to 2500 ng/mL (see Fig. S3) where a loss of the linearity was clearly observed. Assuming a simple 1:1 biomolecular interaction





**Fig. 5.** Calibration curve constructed for TNF $\alpha$  standards prepared in PBS. Represented signals were calculated as the height of the DPV current peak. Error bars estimated as triple of the standard deviation ( $n=3$ ).

model a fitting was performed (solid line in Fig. S3) with a resulting equilibrium constant ( $K_d$ ) of 1.1 nM. This value proved the high affinity of the binding and agrees well with other reports using the same protein reagents [14] endorsing the good behavior of the immunoassay.

### 3.4. Measurements with real human serum.

In order to study the suitability of the developed TNF $\alpha$  immuno-biochip in complex samples, spiked real human serum was employed because of its relevance for this given biomarker. The basal TNF $\alpha$  content of the pooled serum was checked to be below 5 pg/mL by means of standard ELISA. In a first approximation, a sample containing a 95% of serum was injected. This solution was prepared similar to the previously described protocol (in Section 2.4), but using just the remaining 5% solution to properly adjust the concentrations of the TNF $\alpha$  spike, secondary antibody and SAV-AP. Probably due to the complex and charged nature of concentrated serum, the sandwich formation was virtually hindered even at high TNF $\alpha$  contents (data not shown). However, when the serum samples were diluted down to 25%, the effect was effectively removed as indicated by the recovery tests carried out at three different concentrations (see Table 1) where three replicates were used for each test. It must be noted that the effective concentration of the 25% serum samples in this recovery tests was four times that of the performed TNF $\alpha$  spike.

It is interesting to compare these results with other electrochemical biosensors reported for the detection of TNF $\alpha$  biomarker in serum samples [14,16–19]. Eletxigerra et al. [14] and Bettazzi et al. [16] developed two different immunoassays in serum based on functionalized magnetic microparticles and

**Table 1**  
TNF $\alpha$  recovery tests in real human serum samples.

	Serum sample 1	Serum sample 2	Serum sample 3
TNF $\alpha$ spike (ng/mL)	0	20.0	100.0
TNF $\alpha$ detected (ng/mL)	<LOD	18.3 $\pm$ 0.7	94 $\pm$ 6
Recovery (%)	–	91.5	94.3

chronoamperometry and DPV measurements respectively obtaining LODs of 5.8 and 44 pg/mL. Weng et al. [17] proposed a label-free biosensor using  $K_3[Fe(CN)_6]$ -chitosan-glutaraldehyde system for signal transduction on glassy carbon electrodes with a LOD of 10 pg/mL. Li et al. [18] detected down to 2 pg/mL of TNF $\alpha$  by means of prussian blue-functionalized ceria nanoparticles and performed successful recovery tests in serum. Mazloum-Ardakani et al. [19] developed two different electrochemical immunoassays using screen-printed graphite electrodes modified with poly(anthranilic acid) and obtained LODs down to 3.2 pg/mL. Despite the high-sensitivity of these reports, they all include somehow complex protocols with laborious off-chip operations and/or expensive consumables that affect their cost-effectiveness. Moreover, their integration with fluidics for sample processing has not been proved. In contrast, we had demonstrated an integrated disposable device offering a single step and fast TNF $\alpha$  quantification that paves the way for the development of cost-effective lab-on-chip and point-of-care devices.

## 4. Conclusions

In summary, a disposable microfluidic electrochemical TNF $\alpha$  immunosensor has been demonstrated and characterized. Compared to the gold standard (ELISA) the response time has been greatly reduced by optimizing a sandwich immunoassay in a one-step approach. An on-chip control measurement is simultaneously-carried out using non-specific antibodies on a second working electrode available in the dual SPEs, which allows for an immediate qualitative test without the need of obtaining a calibration curve. The developed immuno-biochip allows rapid, cheap and quantitative detection of TNF $\alpha$  with a LOD of 4.1 ng/mL. The performance in real samples has also been successfully evaluated in 25% human serum which proves the applicability of the device.

## Acknowledgements

This work was supported by Gobierno Vasco, Dpto. Industria, Innovación, Comercio y Turismo under the Etortek 2013 Grant No. IE14-391. U. Eletxigerra acknowledges Fundación Centros Tecnológicos Iñaki Goenaga for a PhD grant.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.026>.

## References

- [1] S. Nahavandi, S. Baratchi, R. Soffe, S.-Y. Tang, S. Nahavandi, A. Mitchell, K. Khoshmanesh, Microfluidic platforms for biomarker analysis, *Lab Chip* 14 (9) (2014) 1496–1514, <http://dx.doi.org/10.1039/c3lc51124c>.
- [2] A. Jang, Z. Zou, K.K. Lee, C.H. Ahn, P.L. Bishop, State-of-the-art lab chip sensors for environmental water monitoring, *Meas. Sci. Technol.* 22 (3) (2011) 32001, <http://dx.doi.org/10.1088/0957-0233/22/3/032001>.
- [3] J.Y. Yoon, B. Kim, Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety, *Sensors (Switzerland)* 12 (8) (2012) 10713–10741, <http://dx.doi.org/10.3390/s120810713>.
- [4] J.F. Rusling, Multiplexed electrochemical protein detection and translation to personalized cancer diagnostics, *Anal. Chem.* 85 (11) (2013) 5304–5310, <http://dx.doi.org/10.1021/ac401058v>.
- [5] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P.J. Lamas-Ardiansa, A. Martín-Pernía, A. Costa-García, Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes, *Electrochim. Acta* 53 (10) (2008) 3635–3642, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2007.12.04>.
- [6] B.B. Aggarwal, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (9) (2003) 745–756, <http://dx.doi.org/10.1038/nri1184>.
- [7] J. Martínez-Borra, C. Lopez-Larrea, S. Gonzalez, D. Fuentes, A. Dieguez, E.M. Deschamps, J.M. Perez-Pariente, A. Lopez-Vazquez, R. Francisco, L. Rodrigo, High serum tumor necrosis factor-[alpha] levels are associated with lack of

- response to infliximab in fistulizing Crohn's disease, *Am. J. Gastroenterol.* 97 (9) (2002) 2350–2356, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05990.x>.
- [8] P. Scully, D.P. McKernan, J. Keohane, D. Groeger, F. Shanahan, T.G. Dinan, E.M.M. Quigley, Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity, *Am. J. Gastroenterol.* 105 (10) (2010) 2235–2243, <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2010.159>.
  - [9] R. Namas, A. Ghuma, A. Torres, P. Polanco, H. Gomez, D. Barclay, L. Gordon, S. Zenker, H.K. Kim, L. Hermus, R. Zamora, M.R. Rosengart, G. Clermont, A. Peitzman, T.R. Billiar, J. Ochoa, M.R. Pinsky, J.C. Puyana, Y. Vodovotz, An adequately robust early TNF- $\alpha$  response is a hallmark of survival following trauma/hemorrhage, *PLoS ONE* 4 (12) (2009) e8406, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008406>.
  - [10] J. Martinez-Perdiguero, A. Retolaza, L. Bujanda, S. Merino, Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF $\alpha$  biomarker in human serum, *Talanta* 119 (2014) 492–497, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.063>.
  - [11] W.-C. Law, K.-T. Yong, A. Baev, P.N. Prasad, Sensitivity improved surface plasmon resonance biosensor for cancer biomarker detection based on plasmonic enhancement, *ACS Nano* 5 (6) (2011) 4858–4864, <http://dx.doi.org/10.1021/nn2009485>.
  - [12] L. Luo, Z. Zhang, L. Ma, Determination of recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  in serum by chemiluminescence imaging, *Anal. Chim. Acta* 539 (1–2) (2005) 277–282, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.046>.
  - [13] Y.-K. Bahk, H.-H. Kim, D.-S. Park, S.-C. Chang, J.-S. Go, A New concept for efficient sensitivity amplification of a qcm based immunosensor for TNF- $\alpha$  by using modified magnetic particles under applied magnetic field, *Bull. Korean Chem. Soc.* 32 (12) (2011) 4215–4220, <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.12.4215>.
  - [14] U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguero, S. Merino, R. Villalonga, J.M. Pingarrón, S. Campuzano, Amperometric magnetimmunoassay for the direct detection of tumor necrosis factor alpha biomarker in human serum, *Anal. Chim. Acta* 838 (2014) 37–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.047>.
  - [15] Z. Yin, Y. Liu, L.-P. Jiang, J.-J. Zhu, Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor  $\alpha$  based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres, *Biosens. Bioelectron.* 26 (5) (2011) 1890–1894, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.03.025>.
  - [16] F. Bettazzi, L. Enayati, I.C. Sánchez, R. Motaghd, M. Mascini, I. Palchetti, Electrochemical bioassay for the detection of TNF- $\alpha$  using magnetic beads and disposable screen-printed array of electrodes, *Bioanalysis* 5 (1) (2012) 11–19, <http://dx.doi.org/10.4155/bio.12.293>.
  - [17] S. Weng, M. Chen, C. Zhao, A. Liu, L. Lin, Q. Liu, J. Lin, X. Lin, Label-free electrochemical immunosensor based on  $K_3[Fe(CN)_6]$  as signal for facile and sensitive determination of tumor necrosis factor- $\alpha$ , *Sens. Actuators B: Chem.* 184 (0) (2013) 1–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.141>.
  - [18] T. Li, Z. Si, L. Hu, H. Qi, M. Yang, Prussian Blue-functionalized ceria nanoparticles as label for ultrasensitive detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ , *Sens. Actuators B: Chem.* 171–172 (0) (2012) 1060–1065, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.034>.
  - [19] M. Mazloum-Ardakani, L. Hosseinzadeh, Z. Taleat, Two kinds of electrochemical immunoassays for the tumor necrosis factor  $\alpha$  in human serum using screen-printed graphite electrodes modified with poly(anthranilic acid), *Microchim. Acta* 181 (2014) 917–924, <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-014-1186-9>.
  - [20] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M.R. Tam, B.H. Weigl, Microfluidic diagnostic technologies for global public health, *Nature* 442 (7101) (2006) 412–418, <http://dx.doi.org/10.1038/nature05064>.
  - [21] P.K. Yuen, V.N. Goral, Low-cost rapid prototyping of flexible microfluidic devices using a desktop digital craft cutter, *Lab Chip* 10 (3) (2010) 384–387, <http://dx.doi.org/10.1039/b918089c>.
  - [22] M. Moreno-Guzman, M. Eguilaz, S. Campuzano, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarrón, Disposable immunosensor for cortisol using functionalized magnetic particles, *Analyst* 135 (8) (2010) 1926–1933, <http://dx.doi.org/10.1039/C0AN00206B>.
  - [23] J.H. Wang, K. Wang, B. Bartling, C.-C. Liu, The detection of alkaline phosphatase using an electrochemical biosensor in a single-step approach, *Sensors* 9 (11) (2009) 8709–8721, <http://dx.doi.org/10.3390/s91108709>.
  - [24] J. Liu, L. Cheng, B. Liu, S. Dong, Covalent modification of a glassy carbon surface by 4-aminobenzoic acid and its application in fabrication of a polyoxometalates-consisting monolayer and multilayer films, *Langmuir* 16 (19) (2000) 7471–7476, <http://dx.doi.org/10.1021/la9913506>.
  - [25] V. Escamilla-Gómez, D. Hernández-Santos, M.B. González-García, J.M. Pingarrón-Carrazón, A. Costa-García, Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor, *Biosens. Bioelectron.* 24 (8) (2009) 2678–2683, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2009.01.043>.

## Biographies

**Unai Eletxigerra** is a member of the Micro and Nanofabrication Unit at IK4-Tekniker. He obtained a BS degree in mechanical engineering from the University of the Basque Country in 2010. He joined IK4-Tekniker in 2011, focusing his activity on the development of electrochemical biosensors as the main research line of his PhD thesis. In 2012 he received a Master degree in advanced materials.

**Josu Martinez-Perdiguero** received his BS and PhD in physics with honors from the University of the Basque Country in 2005 and 2009. In 2010, he joined the Micro and Nanofabrication Unit of IK4-Tekniker and has since been researching on new highly sensitive plasmon-based and electrochemical biosensors with a special focus on practical aspects such as lower limits of detection, performance with real samples and system integration. He is author of 19 indexed articles.

**Santos Merino** received the PhD degree in solid state physics from the Basque Country University in 1997. Since then, he has been a Researcher at IK4-Tekniker. He is currently the Head of Micro and Nanofabrication Unit at IK4-Tekniker, developing most of the activity in biosensors and tissue engineering as well as nanofabrication-based processes for photonic applications.



# Amperometric magnetoimmunosensor for ErbB2 breast cancer bio-marker determination in human serum, cell lysates and intact breast cancer cells

U. Eletxigerra<sup>a,b</sup>, J. Martinez-Perdiguero<sup>b,\*</sup>, S. Merino<sup>a,b</sup>, R. Barderas<sup>c</sup>,  
R.M. Torrente-Rodríguez<sup>d</sup>, R. Villalonga<sup>d</sup>, J.M. Pingarrón<sup>d</sup>, S. Campuzano<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Micro-NanoFabrication Unit, IK4-Tekniker, Eibar, Spain

<sup>b</sup> CIC microGUNE, Arrasate, Mondragón, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 19 January 2015

Received in revised form

2 March 2015

Accepted 9 March 2015

Available online 10 March 2015

### Keywords:

Magnetoimmunosensor

Amperometry

ErbB2

Serum

Lysates

Intact cancer cells

Breast cancer

## ABSTRACT

A highly sensitive amperometric magnetoimmunosensor for the determination of ErbB2 protein, a well-known biomarker related to high-impact high-incidence diseases such as breast cancer, is described. A sandwich format involving the covalent immobilization of a specific capture antibody onto magnetic beads (MBs) and incubation of the modified MBs with a mixture solution of the antigen and a HRP-labeled detector antibody was used. The resulting modified MBs were captured on the surface of a disposable screen-printed carbon electrode (SPCE) and the amperometric responses at  $-0.20$  V were measured. This ErbB2 magnetoimmunosensor exhibited a very low detection limit of  $26 \text{ pg mL}^{-1}$  far below the established cut-off for this biomarker ( $15 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and was successfully applied to the quantitation of ErbB2 in human serum and cell lysates samples without any matrix effect. In addition, the developed assay allowed the assessment of ErbB2 status directly in intact breast cancer cells. The results correlated well with those obtained with a commercial ELISA method, thus demonstrating that the new magnetoimmunosensing platform offers a truthful and useful analytical tool to be easily applied in breast cancer diagnosis through either ErbB2 protein determination or breast cancer cell status detection.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide, accounting for 23% of total cancer incidences and contributing to nearly 14% of the cancer-related mortality (Mahfoud et al., 2014). The disease can be subdivided in four main classes: (i) hormone (estrogen or progesterone) receptor positive, (ii) ErbB2 positive, (iii) hormone receptor and ErbB2 positive and (iv) hormone receptor and ErbB2 negative (triple negative) breast cancer (Patris et al., 2014).

Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu, ErbB2 or CD340) is a key prognostic marker and an effective therapeutic

treatment target for breast cancer that plays a major role in promoting breast cancer cell proliferation and malignant growth (Zhu et al., 2013); (Marques et al., 2014). This 185 kDa glycoprotein is overexpressed in around 20–25% of invasive breast cancers which is associated with poor-prognosis as well as reduced survival (Patris et al., 2014). Other cancers, such as ovarian, stomach, pancreatic and prostate, have also been shown to exhibit increased expression of ErbB2 (Al-Khafaji et al., 2012). Nowadays a treatment using a monoclonal antibody (trastuzumab) to ErbB2 is advocated, but it is only effective in patients that have excess receptor levels thus requiring the screening of those patients who are eligible for treatment (Al-Khafaji et al., 2012). ErbB2 is involved in cellular signaling pathways, which may lead to proliferation, growth, apoptosis and differentiation. These processes are essential to life, but loss of control within these pathways is frequently associated with disease, especially cancer. The ErbB2 protein has three distinct domains; an extracellular region, a transmembrane hydrophobic section, and an intracellular zone with tyrosine kinase activity. The extracellular domain (ECD) can be cleaved by matrix

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [unai.eletxigerra@tekniker.es](mailto:unai.eletxigerra@tekniker.es) (U. Eletxigerra), [jmartinez@cicmicrogune.es](mailto:jmartinez@cicmicrogune.es) (J. Martinez-Perdiguero), [santos.merino@tekniker.es](mailto:santos.merino@tekniker.es) (S. Merino), [rbarderas@quim.ucm.es](mailto:rbarderas@quim.ucm.es) (R. Barderas), [rebeca.magnolia@gmail.com](mailto:rebeca.magnolia@gmail.com) (R.M. Torrente-Rodríguez), [rvillalonga@quim.ucm.es](mailto:rvillalonga@quim.ucm.es) (R. Villalonga), [pingarro@quim.ucm.es](mailto:pingarro@quim.ucm.es) (J.M. Pingarrón), [susanacr@quim.ucm.es](mailto:susanacr@quim.ucm.es) (S. Campuzano).

metalloproteases, which leads to increased phosphorylation of the tyrosine kinase region and therefore escalated levels of signaling (Al-Khafaji et al., 2012). Indeed, the soluble cleaved form of ErbB2 protein (sErbB2 or ErbB2 ECD), found in blood, has been shown to be a valuable marker for tumor diagnosis in ErbB2-positive breast cancer (Mahfoud et al., 2014). Increased levels of sErbB2 in serum are associated with a poor prognosis, reduced therapeutic response and decreased survival chances and are observed in patients with highly aggressive breast tumors (Al-Khafaji et al., 2012). Additionally, the importance of assessing ErbB2 in circulating tumor cells (CTCs) as a prognostic indicator of disease-free survival and response to targeted therapy has been highlighted by recent evidence (Liu et al., 2013); (Mahfoud et al., 2014).

Currently, the established diagnostic methods, immunohistochemistry (IHC) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for the assessment of ErbB2 status, are complex, involve time-consuming steps, require specially trained personnel and only provide semi-qualitative results, separating patients into ErbB2 -positive and ErbB2 -negative groups (Al-Khafaji et al., 2012); (Marques et al., 2014). Moreover, an in-depth analysis of the publications related to ErbB2 testing demonstrated that on average, 20% (range 10–40%) of the ErbB2-negative patients may be misclassified regarding ErbB2 status (~2.5 million cases worldwide) and may develop a ErbB2-positive recurrent breast cancer. Results achieved in numerous clinical studies with thousands of breast cancer patients have demonstrated that serum ErbB2 testing is complementary to IHC/FISH tests and aids in the follow-up of the clinical course of disease, providing an effective way to monitor ErbB2-positive patients and also identifying those breast cancer patients initially misclassified as ErbB2-negative patients by tissue testing. The FDA has defined a standard cut-off of  $\geq 15 \text{ ng mL}^{-1}$  for the sErbB2 test (Carney et al., 2013). Thus, the establishment of a fast, simple and cost-effective method for the sensitive detection of both the sErbB2 and ErbB2-overexpressing cells is desirable (Zhu et al., 2013), which should result in an early assessment of ErbB2 status, and early diagnosis and monitoring of ErbB2-positive cancer patients. Then, this method should be of great significance not only for increasing the survival rate, but also for saving cost and time in successful prognosis of the disease (Emami et al., 2014).

For this purpose electrochemical immunosensors represent a great alternative because of their simplicity of use and high selectivity and sensitivity, which allow early detection of many diseases. Moreover, the required instrumentation is inexpensive and has been reduced to pocket-size dimensions ideal for the integration in *point-of-care* (POC) devices (Al-Khafaji et al., 2012); (Marques et al., 2014). Magnetic beads (MBs) are known to be a powerful tool in a variety of bioassays improving the performance of disposable electrochemical immunosensors mainly in terms of sensitivity, reduced assay time and minimization of matrix effects, essential to perform determinations in complex matrices (Conzuelo et al., 2012); (Esteban-Fernández de Ávila et al., 2012); (Esteban-Fernández de Ávila et al., 2013). Although some electrochemical immunosensors for the analysis of ErbB2 appear in the literature (Mucelli et al., 2008), (Al-Khafaji et al., 2012); (Zhu et al., 2013); (Marques et al., 2014); (Emami et al., 2014); (Patris et al., 2014) most of them required multiple reagents and complex and time-consuming substrate or nanomaterials modification protocols.

In this work we report, for the first time, the development of an amperometric magnetosensor for the clinically-relevant quantification of ErbB2 protein in both human serum and cell lysates with the additional capability of discriminating *in vitro* ErbB2-positive from ErbB2-negative breast cancer cells. This fast, simple, versatile and sensitive determination method could have a positive impact in the early diagnosis and continuous monitoring

of this high-incidence cancer.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Apparatus and electrodes

A DRP-STAT400 potentiostat from DropSens (Spain) was employed to carry out all electrochemical measurements. The screen printed carbon electrodes (SPCEs), consisting of a circular 4-mm carbon working electrode (WE), a carbon counter electrode (CE) and a silver pseudo-reference electrode (RE) and the specific connector (DRP-CAC) were also acquired from DropSens. A Mix-Mate microtube mixer (Eppendorf, Germany) was used for incubating the solutions and a DynaMag-2 Magnet (Invitrogen, Spain) for the magnetic separation of the MBs. A homemade poly (methyl methacrylate) dock with an encapsulated neodymium (Nd) permanent magnet (AimanGZ, Spain) was employed to capture the MBs onto the working electrode surface.

### 2.2. Reagents and solutions

For all the experiments, carboxylic acid-modified MBs (HOOC-MBs, 2.8 mm,  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  Dynabeads M-270 Carboxylic Acid) from Invitrogen (Spain) were used as received. Recombinant human ErbB2 protein, rabbit anti-ErbB2 monoclonal antibody (anti-ErbB2) and rabbit anti-ErbB2 monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) were purchased as an ELISA Kit (ref. SEKA10004, Sino Biological Inc., China). Mouse immunoglobulin G (MIgG), human immunoglobulin G (HIgG), human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA), were from Jackson ImmunoResearch (refs. 015-000-003, 009-000-003, 009-000-051 and 001-000-161, respectively). For the assay optimization tests in serum, human serum from human male AB plasma was purchased from Sigma-Aldrich (Spain, ref. H4522) and real samples from two healthy individuals were kindly supplied by Biodonostia Health Research Institute.

N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), ethanolamine hydrochloride (ETA), hydroquinone (HQ) and Tween 20 were from Sigma-Aldrich (Spain). Sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, tris (hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), sodium chloride (NaCl) and potassium chloride (KCl) were purchased from Scharlau (Spain). Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was from Fisher Bio-reagents. All other chemicals were of analytical grade and ultrapure water (Millipore Milli-Q) was used throughout.

The following buffers and solutions were prepared daily: 0.01 M phosphate buffered saline at pH 7.5 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl (PBS); 50 mM MES buffer at pH 5.0; 50 mM phosphate buffer at pH 6.0 (PB); 100 mM Tris-HCl buffer at pH 7.2; and PBS containing 0.05% (w/v) Tween 20 (PBST).

### 2.3. Biofunctionalization of MBs and sandwich immunoassay

Unless otherwise stated, for all steps including separation and washing or resuspension, the MBs were placed on the magnetic separator for 2 min before removing the supernatant. Also, all incubation and washing steps were carried out under continuous stirring at 950 rpm and 25 °C and in volumes of 37.5  $\mu\text{L}$  and 75  $\mu\text{L}$ , respectively.

The biofunctionalization of the MBs was carried out as follows. First, 6  $\mu\text{L}$  of HOOC-MBs were pipetted onto a 1.5 mL microtube and washed twice with MES buffer (pH 5.0) during 5 min. The carboxyl groups on the surface of the MBs were activated by incubation in a freshly prepared solution of 100 mM EDC and



100 mM NHS in MES during 35 min. Two washing steps in MES buffer were carried out before the MBs were resuspended in a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  rabbit anti-ErbB2 solution (prepared also in MES pH 5.0) and incubated during 1 h. The suspension was washed two times and further mixed with 1 M ETA solution in PBS, pH 8.5 during 1 h to block the remaining unreacted groups on the MBs. Finally, the MBs were washed with Tris–HCl pH 7.2 buffer and resuspended in  $75 \mu\text{L}$  of pH 7.5 PBST and kept at  $4^\circ\text{C}$  until use.

To carry out the sandwich immunoassay, the anti-ErbB2 bio-functionalized MBs were resuspended in the ErbB2 standard/samples solutions supplemented with  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  HRP-anti-ErbB2 (prepared in PBST, pH 7.5) and incubated for 1 h. The final modified MBs were then washed twice in PBST and resuspended in  $150 \mu\text{L}$  of pH 6.0 PB buffer ready for measurement.

The prepared volume of modified MBs explained above ( $150 \mu\text{L}$ ) was employed to perform three replicates for each sample. Therefore, it can be concluded that an effective volume of  $2 \mu\text{L}$  of the initial MBs stock was actually employed in each measurement.

#### 2.4. Amperometric detection

The amperometric measurements were performed on disposable SPCEs by magnetically capturing the modified MBs on the carbon working electrode (WE). An Nd magnet integrated on a chip dock was positioned below the WE and reproducibly concentrated the MBs when  $45 \mu\text{L}$  of the MBs solution was gently pipetted over it. The docked chip with the captured MBs was then plugged to the potentiostat and the electrodes sunk in a stirred electrochemical cell containing 8 mL of a 1 mM HQ PB solution (pH 6.0). The amperometric signal was monitored by applying a  $-0.20 \text{ V}$  potential (vs. Ag pseudo-reference electrode). The signal was recorded during 60 s as baseline before  $20 \mu\text{L}$  of a 0.1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution were added into the cell. This procedure triggered the redox process described in Fig. 1 and gave rise to a signal changes that readily reached a steady state. At least three replicates were measured for each standard/sample.

#### 2.5. Cells culture and lysate production

MCF-7, MDA-MB-436 and SK-BR-3 breast cancer cell lines were grown according to established protocols in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin, and 2.5 mM L-glutamine (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with recommended nutrients (Ceran et al., 2012); (Torrente-Rodriguez et al., 2014).

To lyse the cells, they were washed with cold PBS, incubated for 5 min with PBS 4 mM EDTA to detach them from the plates, centrifuge at 1200 rpm to remove PBS 4 mM EDTA, and followed by the addition of 1 mL of cold lysis buffer (25 mM Tris–HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 1X protease inhibitor cocktail, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM activated sodium orthovanadate. Then, cells were incubated on ice for 10 min, passed through a 25 gauge needle attached on a 1 mL syringe for 10 times and transferred to a microcentrifuge tube. The cell lysate was then clarified by centrifuging at 13,200 rpm at  $4^\circ\text{C}$  for 15 min. Total protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and the lysates stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further use.

#### 2.6. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) and immunodetection analysis

Cancer cell lysates ( $25 \mu\text{g}$  of each protein extract) were

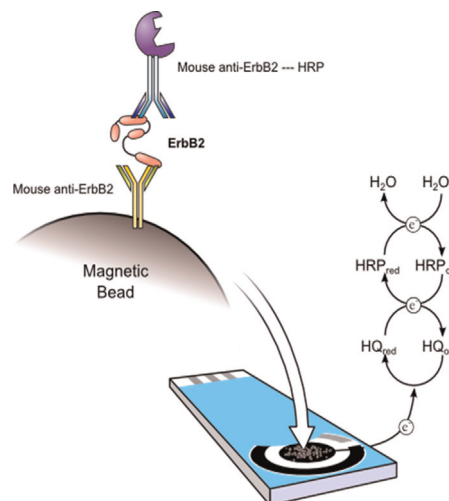


Fig. 1. Schematic representation of the ErbB2 sandwich magnetosensor.

analyzed by 10% SDS-PAGE with Coomassie Blue R-250 staining (Sigma-Aldrich).

For immunodetection (Barderas et al., 2013a),  $50 \mu\text{g}$  of each protein extract were run in parallel using 10% SDS-PAGE. Then, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra) using semi-dry transfer (Bio-Rad) (Barderas et al., 2013b). After blocking, membranes were incubated at optimized dilutions with alternatively anti-ErbB2 monoclonal antibody (Abcam) or anti-tubulin monoclonal antibody (Sigma) as loading control followed by incubation with HRP-anti-mouse IgG (Pierce) at 1:5000 dilution. Specific reactive proteins were visualized with Super-Signal West Pico Maximum Sensitivity Substrate (Pierce).

#### 2.7. Microscopy analysis

The binding of anti-ErbB2-MBs to breast cancer cells over-expressing ErbB2 receptor was evaluated by incubating  $37.5 \mu\text{L}$  of  $1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$  of MDA-MB-436, MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells, detached from the cell culture plate with PBS 4 mM EDTA to maintain the integrity of membrane proteins, with anti-ErbB2-MBs according to Section 2.3 protocol. After the washings steps and prior to the labeling with the detector antibody, MBs were visualized in an Olympus CK40 microscope equipped with an Olympus DP12 camera at  $\times 10$  and  $\times 20$  magnification.

#### 2.8. Application to the analysis of real samples

The magnetosensor was employed for the determination of sErbB2 in human serum and full-length ErbB2 in cell lysates samples as well as for the assessment of ErbB2 status in different breast cancer cells. Once verified the absence of matrix effect, the anti-ErbB2-MBs, prepared as described in Section 2.3, were re-suspended in a  $37.5 \mu\text{L}$  aliquot of the appropriately diluted samples and labeling with the HRP-anti-ErbB2 and amperometric detection were carried out using the same protocol described above for ErbB2 standards. The serum samples were diluted down to 40% in PBS buffer containing 1 M NaCl, 2% Tween 20 and 0.5% BSA (Elettigerra et al., 2014). The cell lysates were diluted in PBST up to a final amount of  $2.5 \mu\text{g}$  and the cell cultures were assayed at a  $1 \times 10^6 \text{ cells per mL}$  concentration prepared in filtered PBS. The concentration of sErbB2 in human serum and full-length ErbB2 in cell lysates was determined by interpolation of the measured amperometric signals into the calibration graph constructed with ErbB2 standards.

The concentration of ErbB2 and the number of ErbB2 receptors

in the three cell lines assayed could be also roughly estimated by referring to the standards calibration plot.

### 3. Results and discussion

Fig. 1 summarizes the fundamentals of the immunosensor and electrochemical reactions employed for the determination of ErbB2 in this work. The magnetoimmunosensor is based on a sandwich format in which a primary monoclonal antibody anti-ErbB2 is covalently immobilized onto EDC/NHS activated HOOC-MBs, followed by a blocking incubation step to passivate all unreacted groups. The modified beads are then used to capture the protein from the sample solution and a sandwich assay is performed by adding a secondary monoclonal antibody anti-ErbB2 labeled with HRP. Then, the MBs bearing the sandwich immunocomplexes are magnetically captured on the SPCE and the magnet holding block-SPCE (with the MBs captured on its surface) assembly was transferred to the electrochemical cell where the biorecognition event was monitored by the amperometric measurement of the enzymatic reduction current generated in the presence of the HQ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redox system.

#### 3.1. Optimization of experimental variables

To determine the optimal analysis conditions, the experimental parameters that could affect the magnetoimmunosensor response were optimized by considering the best discrimination between the electrochemical current values obtained at  $-0.20$  V (vs. Ag pseudo-reference electrode) in the presence (S) of  $5.0 \text{ ng mL}^{-1}$  and in the absence (N) of ErbB2 (signal-to-noise ratio, S/N). The detection potential value was previously optimized for the same electrochemical detection system (Eletxigerra et al., 2014) and the experimental conditions used in the HOOC-MBs activation procedure, the successive washing steps and the unreacted carboxylic groups blocking step were used according to the protocol given by the MBs supplier. Table S1 in the Supporting information collects the ranges tested for all the checked variables as well as the selected corresponding values.

As an example of these optimization studies, Fig. S1 in the Supporting information shows the results obtained in the optimization of capture and detector antibodies concentration. As it can be seen in the Fig. S1a, the S/N ratio increases with the capture antibody concentration in the whole range studied ( $0.0$ – $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Considering the good sensitivity achieved and in order to reduce cost, a concentration of  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of primary anti-ErbB2 was selected for further work. According to the MBs supplier specifications an estimation of ca.  $0.3 \text{ pg}$  antibody per bead could be made. The anti-ErbB2-HRP concentration was optimized in the  $0.0$ – $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  range. The results displayed in Fig. S1b show as a maximal S/N ratio was found for  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , which was, consequently, selected for further work.

With the aim of reducing the analysis time and simplifying the assay protocol, the results achieved after performing the sandwich immunoassay in two successive steps (60 min incubation of the anti-ErbB2-MBs with the ErbB2 sample solution, followed by a 60 min incubation step in the anti-ErbB2-HRP solution) were compared with those obtained by carrying out the assay in a single step (involving the simultaneous capture of the antigen and labeling in a 60 min incubation of the anti-ErbB2-MBs in a mixture solution containing ErbB2 and anti-ErbB2-HRP). This comparison was also made by measuring the current values obtained in the absence and in the presence of  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  of ErbB2, well below the established clinical cut-off. The results (not shown) demonstrated clearly as the methodology involving one incubation step provided the largest S/N current ratio besides obviously reducing drastically

the total assay time. This behavior can be attributed to a higher efficiency of the immunoreactions as a consequence of the lower steric hindrance existing when the target antigen and detector antibody were free in homogenous solution. The effect of the incubation time of the anti-ErbB2-MBs in the mixture solution was also evaluated giving 60 min as the optimal incubation time. Accordingly, the simplified one-step protocol was employed for the implementation of the immunosensor.

#### 3.2. Analytical characteristics

Under the optimized conditions, the response of the magnetoimmunosensor was evaluated towards different concentrations of ErbB2 standards prepared in PBST (Fig. S2 in the Supporting information). A linear relationship was found over the  $0.1$ – $32.0 \text{ ng mL}^{-1}$  range, with a slope value of  $(0.01046 \pm 0.00007) \mu\text{A ng}^{-1} \text{ mL}$ , and an intercept of  $(0.02330 \pm 0.00001) \mu\text{A}$  ( $r=0.999$ ). The LOD and the determination limit (LQ), 26 and  $87 \text{ pg mL}^{-1}$ , respectively, were calculated according to the 3s and 10s criteria (both expressed in concentration units), where s was estimated as the standard deviation of ten amperometric signals measured without target ErbB2. The achieved LOD is approximately 577 times lower than the clinical cut-off value of sErbB2 established at  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  (Al-Khafaji et al., 2012); (Carney et al., 2013); (Mahfoud et al., 2014); (Marques et al., 2014) which makes the magnetoimmunosensor a useful and attractive tool for the early diagnosis of breast cancer associated with ErbB2 overexpression.

Moreover, amperometric measurements for  $5.0 \text{ ng mL}^{-1}$  ErbB2 made with 5 different magnetoimmunosensors prepared in the same way yielded a relative standard deviation (RSD) value of 5.6%, showing a good reproducibility of the magnetoimmunosensor fabrication procedure and the signal transduction methodologies.

#### 3.3. Selectivity of the magnetoimmunosensor

In order to assess the selectivity of the developed magnetoimmunosensor in real samples, potential cross-reactivities and non-specific adsorptions were also evaluated in the presence of various non-target compounds at their commonly found concentrations in serum ( $5.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  HSA,  $11.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  HlgG,  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  TNF $\alpha$ ,  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA and  $3 \text{ mM}$  EDTA).

These experiments were performed by comparing the current values measured with the magnetoimmunosensor for  $0.0$  and  $5.0 \text{ ng mL}^{-1}$  ErbB2 in the absence and in the presence of the potential interfering compounds. Fig. S3 in the Supporting information clearly shows that, even at the extraordinary high concentrations employed in comparison with that of the target protein, none of the tested compounds did affect significantly the accurate determination of ErbB2 as it will be demonstrated in the results presented in the following Sections.

#### 3.4. Application to the analysis of ErbB2 in human serum and cell lysates

The feasibility of the proposed method to quantify ErbB2 was evaluated in three different human serum samples: one commercial and two collected from healthy patients. The results obtained with the magnetoimmunosensor were compared with those provided by a commercial ELISA kit using the same immunoreagents (see Table 1).

These experiments further demonstrated the selectivity of the magnetoimmunosensor, since, despite the complexity of serum sample containing a high content of some proteins such as BSA ( $\sim 50 \text{ mg mL}^{-1}$ ), it allowed the reliable determination of pM concentrations of ErbB2.

**Table 1**

Determination of the ErbB2 (in the units specified) in different human serum samples with the developed amperometric magnetoimmunosensor and comparison with the results obtained by means of a commercial ELISA spectrophotometric kit.

Samples		ELISA	Magnetoimmunosensor
Sera (ng mL <sup>-1</sup> )	Commercial	24.5 ± 0.8 RSD <sub>n=3</sub> = 1.3%	26 ± 2 RSD <sub>n=3</sub> = 3.3%
	Healthy patient 1	14.6 ± 0.3 RSD <sub>n=3</sub> = 0.7%	15 ± 1 RSD <sub>n=3</sub> = 2.9%
	Healthy patient 2	15.5 ± 0.6 RSD <sub>n=3</sub> = 1.6%	16 ± 2 RSD <sub>n=3</sub> = 5.7%
Cell lysates (pg µg <sup>-1</sup> )	MCF-7	(69 ± 5) RSD <sub>n=3</sub> = 3.1%	(67 ± 14) RSD <sub>n=3</sub> = 8.7%
	MDA-MB-436	(65 ± 12) RSD <sub>n=3</sub> = 7.3%	(64 ± 6) RSD <sub>n=3</sub> = 5.5%
	SK-BR-3	(198 ± 12) RSD <sub>n=3</sub> = 2.5%	(205 ± 23) RSD <sub>n=3</sub> = 4.5%

These encouraging results prompted us to evaluate the performance of the implemented magnetoimmunosensor as an *in situ* testing system in lysates of breast cancer cell lines to mimic cancerous lysates. For this purpose, three different metastatic breast cancer cell lines expressing varying levels of ErbB2: ErbB2-negative: MDA-MB-436; ErbB2-low: MCF-7 and ErbB2-high: SK-BR-3, were selected. These determinations are particularly challenging because of the high sensitivity required since the raw lysates include a small amount of the target protein as well as many other cell components.

Cancer cell lysates were also analyzed by 10% SDS-PAGE with both Coomassie Blue staining and immunostaining to assess the presence of ErbB2 in these preparations. As it can be observed in Fig. S4 in the Supporting information, the ErbB2 biomarker was noticeably overexpressed in the SK-BR-3 cells, according to the high amount of this protein detected in the lysate.

To perform these experiments, 2.5 µg of raw lysates were used. Fig. 2 shows as the magnetoimmunosensor response were slightly different with respect to the blank for MCF-7 and MDA-MB-436 while it was significantly larger for SK-BR-3, pointing out that ErbB2 is highly expressed only in the SK-BR-3 cell line compared with MCF-7 and MDA-MB-436 cell lines. No matrix effect was apparent for ErbB2 determination when the lysate amount used was equal or lower than 2.5 µg. This fact was verified by

**Table 2**

Estimation of the ErbB2 amount and the number of ErbB2 receptors per cell in the cell lines assayed.

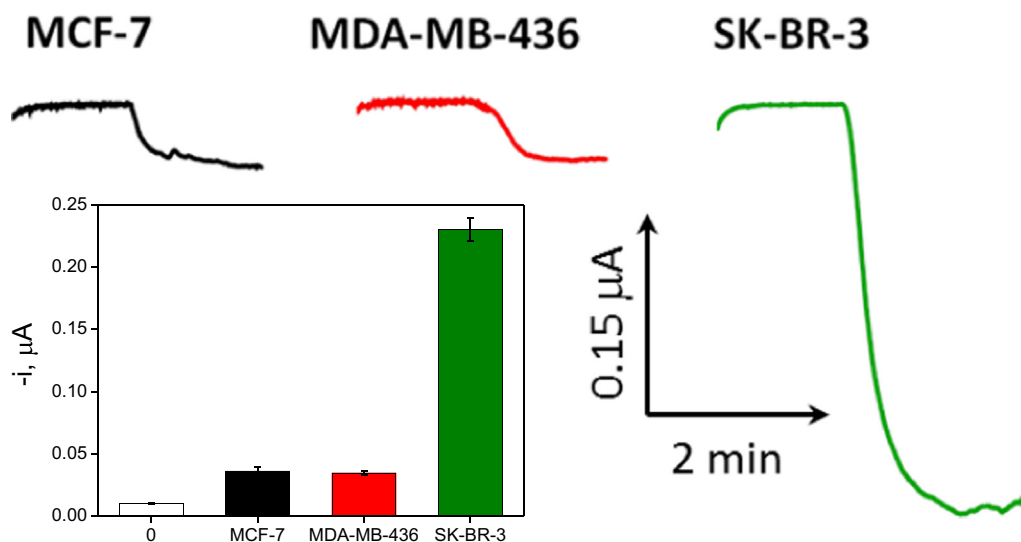
Cell line	[ErbB2], fg cell <sup>-1</sup>	ErbB2-receptors cell <sup>-1</sup> × 10 <sup>-3*</sup>
MCF-7	6.9 ± 0.8	22 ± 2
MDA-MB-436	1.4 ± 0.2	4.7 ± 0.5
SK-BR-3	162 ± 18	530 ± 60

\* Estimated by interpolating the amperometric signal provided by the magnetoimmunosensor in the *in vitro* experiments with cancer cells in the ErbB2 standards calibration plot (Fig. S2). Once known the corresponding concentration of ErbB2 in ng mL<sup>-1</sup>, a rough estimation of the number of ErbB2 receptors per cell can be made with the number of cells used in the experiment, the molecular weight of ErbB2 (185 kDa) and the Avogadro's number.

constructing calibration plot from the cell lysates diluted with PBST upon subsequent adequate spiking with increasing amounts of a standard ErbB2 solution up to 25 ng mL<sup>-1</sup>. The slope values obtained for the respective calibration plots in all the assayed cell lysates (corresponding to the three different cell lines) were not statistically different to those obtained for buffered standard ErbB2 solutions when the total amount of cell lysate used did not exceed 2.5 µg and, therefore, the target protein could be determined by simple interpolation of the amperometric signals measured from the lysates into the calibration graph constructed with ErbB2 standards.

The results are summarized in Table 2. A hypothesis testing carried out demonstrated the absence of statistical significant differences in the mean values estimated for the all the samples analyzed with both methods at the significance level 0.05.

The feasibility of the methodology was also evaluated to perform the determination of ErbB2 in cell lysate mixtures of SK-BR-3 + MCF-7, SK-BR-3 + MDA-MB-436 and SK-BR-3 + MCF-7 + MDA-MB-436 (1.25 µg each). As it is shown in Fig. S5, while cell lysates from MCF-7 and MDA-MB-436 cells provided current values similar to the blank, the magnetoimmunosensor response was significantly different with respect to the blank for ErbB2-overexpressing SK-BR-3 cells. Also, the magnetoimmunosensor provided similar amperometric responses to those measured for the SK-BR-3 alone for all the mixtures tested, which is in agreement with the non-detectable level of ErbB2 in MCF-7 and MDA-MB-436 cells lines under these conditions. Moreover it should be mentioned that it was not possible to perform experiments with larger amounts of cell lysate mixtures due to the matrix effect



**Fig. 2.** Determination of ErbB2 in cell lysates. Amperometric responses measured with the magnetoimmunosensor in the absence and in the presence of 2.5 µg of cell lysates. Error bars estimated as triple of the standard deviation ( $n=3$ ).



observed for cell lysates amount higher than 2.5  $\mu\text{g}$ . Furthermore, the ErbB2 concentration estimated in the lysate mixtures ranged from 176 to 209  $\text{pg } \mu\text{g}^{-1}$  in agreement with the value given in Table 1 for SK-BR-3 cells alone. These results demonstrated fairly well the high selectivity of the approach to accurately determine the target protein content even in the presence of a large excess of other non-target components.

It is important to note also that the poor sensitivity of classical immunochemical assays, such as Western blotting, makes it necessary to use 50  $\mu\text{g}$  of cell lysate to detect the target protein. Conversely, useful amperometric signals could be achieved with the magnetoimmunosensor even using 1.0  $\mu\text{g}$  of lysate of ErbB2-overexpressing cells.

The proposed sandwich magnetoimmunosensor can be envisioned as a potential test to screen clinical samples for a prognostic evaluation to distinguish between aggressive tumors with poor or favorable prognosis.

### 3.5. *In vitro* detection of ErbB2-overexpressing cells

To expand the applicability of the proposed approach, we also explored the feasibility of the methodology to be applied for the *in vitro* detection of ErbB2 directly in the cancer cells.

The responses provided by the magnetosensor discriminated between the ErbB2 expression levels in the three different cell lines. A significantly higher response is obtained for the SK-BR-3 breast cancer cells, whereas a small response is observed for the MCF-7 and MDA-MB-436 breast cancer cells. This result demonstrates the good selectivity of the proposed sensor for the specific *in vitro* detection of ErbB2-overexpressing breast cancer cells. By interpolating the amperometric signals provided by the magnetoimmunosensor in these *in vitro* experiments into the ErbB2 standards calibration curve, a rough estimation of the target protein amount and the number of ErbB2 receptors per cell in the three breast cancer cell lines was possible. The results shown in Table 2 are in good agreement with the number of ErbB2-receptors per cell estimated by other authors of about  $(5-6) \times 10^5$  (Shi et al., 2009), (Zhang et al., 2011) for SK-BR-3 and  $(1-2) \times 10^4$  for MCF-7 cells (Aguilar et al., 1999), (Shi et al., 2009) cells.

Moreover, in order to demonstrate that the binding of anti-ErbB2-MBs to ErbB2-expressing cell lines is specific and based only on ErbB2 expression, the anti-ErbB2-MBs were incubated with cultures from the three cell lines assayed following the protocol described in Section 2.8. After performing the described washings steps and just before carrying out the labeling with the detector antibody, the resulting MBs were visualized using an

optical microscope. Photomicrographs (representative pictures are shown in Fig. 3) demonstrated that no MDA-MB-436 cells appeared attached to the MBs. Moreover, very few MCF-7 cells were visible in the  $10\times$  magnification while the SK-BR-3 sample showed the highest number of cell-associated to the MBs. These results are in agreement with the weak expression of ErbB2 in MCF-7 and MDA-MB-436 and the overexpression in SK-BR-3 which explained that these latest cells can be easily captured by the anti-ErbB2-MBs. These results are consistent also with the estimated number of ErbB2 receptors in the different cell lines with the magnetoimmunosensor.

### 3.6. Comparison with other electrochemical immunosensors and commercial ELISA assays

The analytical characteristics provided by the developed magnetoimmunosensor were also compared with data available in the literature for other electrochemical immunosensors reported for ErbB2 determination (Table 3). As it can be deduced, the developed magnetoimmunosensor provides one of the best LODs achieved. In comparison with the two more sensitive approaches reported (Zhu et al., 2013); (Emami et al., 2014) as well as with the two electrochemical immunosensors applied to the determination of ErbB2 in cell lysates (Mucelli et al., 2008) and breast cancer cells (Zhu et al., 2013), it is important to remark the inherent simplicity of our approach which did not require multiple reagents and complex and time consuming substrate modification or biolabel preparation protocols these constituting relevant factors to be considered for designing POC diagnosis and prognosis tests. Moreover, a considerable reduction of the assay time was achieved the one needed in this work being the shorter reported till now (Table 3). In addition, it is worth to mention that it is the first time that the possibility to determine the ErbB2 protein in intact cells has been demonstrated by implementing an electrochemical magnetoimmunosensor using a pair of antibodies from a commercial sandwich ELISA spectrophotometric kit.

In comparison with commercial sandwich ELISA spectrophotometric kits for ErbB2 determination, although the sensitivity is similar, apart from the relatively costly equipment necessary for the assay performance, which is therefore not widely, ELISA methods involve complicated, tedious and time-consuming multistage processes (Mahfoud et al., 2014). An interesting point to be remarked in the comparison with the commercial sandwich ELISAs available for the determination of ErbB2 (including the one whose reagents have been used for the implementation of this magnetoimmunosensor) is that they are recommended for

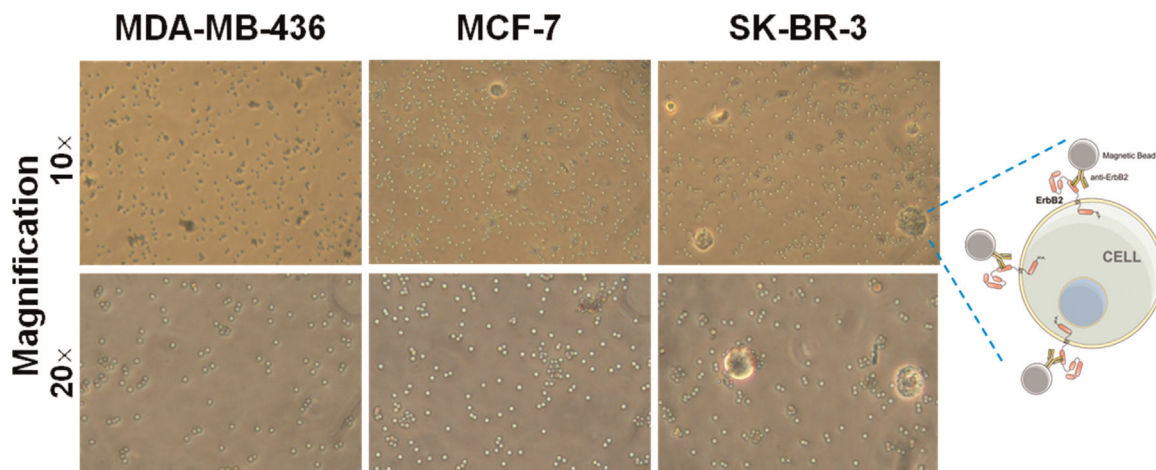


Fig. 3. Representative photomicrographs obtained after incubating the anti-ErbB2-MBs with cells suspensions of MDA-MB-436, MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells.

**Table 3**  
Electrochemical immunosensors reported for ErbB2 determination.

Methodology	Technique	Sample	Concentration range	Sensitivity	LOD	Assay time	Reference
Nanostructured sandwich immunosensor on nanoelectrode ensembles (NEEs) prepared in track-etch polycarbonate membranes.	CV	Cell lysates and tumor lysates	–	–	40 ng mL <sup>-1</sup>	7 h 10 min	(Mucelli et al., 2008)
Sandwich magnetosensor assay onto ProtA-MBs and alkaline phosphatase as enzymatic label	DPV	Serum	6–15 ng mL <sup>-1</sup>	$9.0 \times 10^{-8}$ A ng <sup>-1</sup> mL	6 ng mL <sup>-1</sup>	130 min	(Al-Khafaji et al., 2012)
Immunosensor fabricated by covalently immobilizing anti-ErbB2 onto a nanocomposite layer composed of self-assembled 2,5-bis(2-thienyl)-1 H-pyrrole-1-(p-benzoic acid) (DPB) on AuNPs combined with ly-drazine and aptamer-conjugated AuNPs (Hyd – AuNP – Apt Bioconjugate)	SWSV	Serum and breast cancer cells	0.1 pg <sup>-1</sup> mL–100 ng mL <sup>-1</sup>	1.117 $\mu$ A ng <sup>-1</sup> mL	0.037 pg mL <sup>-1</sup>	~18 h + 54 h Hyd – AuNP – Apt Bioconjugate preparation)	(Zhu et al., 2013)
Sandwich immunoassay on a screen-printed gold electrode modified with gold nanoparticles	LSW	Serum	15–100 ng mL <sup>-1</sup>	33.56 $\mu$ A ng <sup>-1</sup> mL	4.4 ng mL <sup>-1</sup>	2 h 50 min	(Marques et al., 2014)
A label free immunosensor fabricated by immobilization of anti-ErbB2-modified iron oxide nanoparticles onto a gold electrode	DPV	Serum	0.01–10 ng mL <sup>-1</sup> and 10–100 ng mL <sup>-1</sup>	5.921 mA ng <sup>-1</sup> mL	0.995 pg mL <sup>-1</sup>	~44 h	(Emami et al., 2014)
Sandwich type immunoassay on SPE based on the use of nanobodies	Amperometry ( $E_{app}$ = –0.20 V)	Spiked cell lysates	1–200 $\mu$ g mL <sup>-1</sup>	–	1 $\mu$ g mL <sup>-1</sup>	~3 h	(Patris et al., 2014)
Sandwich magnetosensor onto HOOC-MBs and HRP as enzymatic label	Amperometry ( $E_{app}$ = –0.20 V)	Serum, cell lysates and breast cancer cells	0.1–32.0 ng mL <sup>-1</sup>	0.01046 $\mu$ A ng <sup>-1</sup> mL	26 pg mL <sup>-1</sup>	70 min	This work

determination of soluble ErbB2 in biological samples (serum, plasma, urine) and cell culture supernatants but all of them would require a previous lysis step to perform the determination in cells or tissues. There are only a few commercial ELISAs specially recommended to monitor ErbB2 protein expression profile in intact cells called Cell-Based ELISA Kits but they are not based in a sandwich format and require seeding, quenching, fixing and permeabilization of the cells onto the bottom of each plate well.

#### 4. Conclusions

We have developed for the first time a sandwich magnetosensor for the determination of ErbB2 protein in complex samples as well as for the discrimination between ErbB2 positive and negative breast cancer cells. This novel magnetosensor was designed by using disposable SPCEs and specifically functionalized MBs. The excellent analytical characteristics of the proposed immunosensor, which compare well and bring some improvements with respect to other published sensors for the analysis of ErbB2 in terms of simplicity and assay time, allowed the determination of the endogenous content of ErbB2 in human serum, raw cell lysates and intact breast cancer cells. The success in the *in vitro* experiments with the magnetosensor compared with commercial ELISAs is attributed to the fact of using MBs as solid supports to perform the immunoreactions which allows faster assay kinetics because the beads are under continuous stirring in suspension. This fact is thought to be essential for improving the accessibility of the ErbB2 receptors to the intact cells surface towards both capture and detector antibodies with no need for previous cell lysis or permeabilization.

The demonstrated capabilities of the developed magnetosensor to determine the target protein far below the established cut-off value in serum samples and for assessing ErbB2 in circulating tumor cells (CTCs) made it a promising tool in breast cancer diagnostics, patient follow-up and monitoring of metastatic breast cancer.

#### Acknowledgements

This work was funded by the Basque Government within the framework of the Etorrek Program (Grant no. IE13-360), the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects, CTQ2012-34238, CTQ2011-24355 and the NANOAVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2013/MT-3029). R. Villalonga acknowledges Ramón & Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Rodrigo Barderas is supported by the Ramón y Cajal Programme of the MINECO. The authors would also like to acknowledge Dr. J.M. Sánchez-Puelles for kindly providing the MDA-MB-436 cell line.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.017>.

#### References

- Aguilar, Z., Akita, R.W., Finn, R.S., Ramos, B.L., Pegram, M.D., Kabbinnavar, F.F., Pietras, R.J., Pisacane, P., Sliwkowski, M.X., Slamon, D.J., 1999. *Oncogene* 18, 6050–6062.
- Al-Khafaji, Q.A.M., Harris, M., Tombelli, S., Laschi, S., Turner, A.P.F., Mascini, M., Marrazza, G., 2012. *Electroanalysis* 24, 735–742.

- Barderas, R., Mendes, M., Torres, S., Bartolome, R.A., Lopez-Lucendo, M., Villar-Vazquez, R., Pelaez-Garcia, A., Fuente, E., Bonilla, F., Casal, J.I., 2013a. *Mol. Cell Proteomics* 12, 1602–1620.
- Barderas, R., Villar-Vazquez, R., Fernandez-Acenero, M.J., Babel, I., Pelaez-Garcia, A., Torres, S., Casal, J.I., 2013b. *Sci. Rep.* 3, 2938. <http://dx.doi.org/10.1038/srep02938>.
- Carney, W.P., Bernhardt, D., Jasani, B., 2013. *Biomarkers in Cancer* 5, 31–39.
- Ceran, C., Cokol, M., Cingoz, S., Tasan, I., Ozturk, M., Yagci, T., 2012. *BMC Cancer* 12, 450. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-450>.
- Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2012. *Anal. Chim. Acta* 737, 29–36.
- Eletxigerra, U., Martinez-Perdiguerro, J., Merino, S., Villalonga, R., Pingarrón, J.M., Campuzano, S., 2014. *Anal. Chim. Acta* 838, 37–44.
- Emami, M., Shamsipur, M., Saber, R., Irajirad, R., 2014. *Analyst* 139, 2858–2866.
- Esteban-Fernández de Ávila, B., Escamilla-Gómez, V., Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J.M., 2012. *Electroanalysis* 24, 51–58.
- Esteban-Fernández de Ávila, B., Escamilla-Gómez, V., Campuzano, S., Pedrero, M., Salvador, J.P., Marco, M.P., Pingarrón, J.M., 2013. *Sens. Actuator B-Chem.* 188, 212–220.
- Liu, Y., Liu, Q., Wang, T., Bian, L., Zhang, S., Hu, H., Li, S., Hu, Z., Wu, S., Liu, B., Jiang, Z., 2013. *BMC Cancer* 13, 202. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-13-202>.
- Mahfoud, O.K., Rakovich, T.Y., Prina-Mello, A., Movia, D., Alves, F., Volkov, Y., 2014. *RSC Adv* 4, 3422–3442.
- Marques, R.C.B., Viswanathan, S., Nouws, H.P.A., Delerue-Matos, C., González-García, M.B., 2014. *Talanta* 129, 594–599.
- Mucelli, S.P., Zamuner, M., Tormen, M., Stanta, G., Ugo, P., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1900–1903.
- Patris, S., De Pauw, P., Vandeput, M., Huet, J., Van Antwerpen, P., Muyldermans, S., Kauffmann, J.M., 2014. *Talanta* 130, 164–170.
- Shi, Y., Huang, W., Tan, Y., Jin, X., Dua, R., Penuel, E., Mukherjee, A., Sperinde, J., Pannu, H., Chenna, A., DeFazio-Eli, L., Pidaparthi, S., Badal, Y., Wallweber, G., Chen, L., Williams, S., Tahir, H., Larson, J., Goodman, L., Whitcomb, J., Petropoulos, C., Winslow, J., 2009. *Diagn Mol Pathol.* 18, 11–21.
- Torrente-Rodriguez, R.M., Campuzano, S., Lopez-Hernandez, E., Montiel, V.R., Barderas, R., Granados, R., Sanchez-Puelles, J.M., Pingarron, J.M., 2014. *Biosens. Bioelectron.* 66C, 385–391.
- Zhang, Y., González, R.M., Zangar, R.C., 2011. *BMC Cancer* 11, 69. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-11-69>.
- Zhu, Y., Chandra, P., Shim, Y.B., 2013. *Anal. Chem.* 85, 1058–1064.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

# Surface plasmon resonance immunosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum and raw cancer cell lysates



Unai Eletxigerra<sup>a</sup>, Josu Martinez-Perdiguero<sup>a, b, \*</sup>, Rodrigo Barderas<sup>c</sup>, José M. Pingarrón<sup>d</sup>, Susana Campuzano<sup>d</sup>, Santos Merino<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Micro-NanoFabrication Unit, IK4-Tekniker, Eibar, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Física Aplicada 1, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Vitoria, Spain

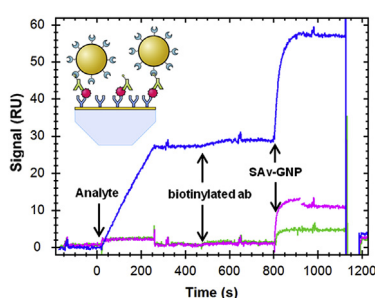
<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

## HIGHLIGHTS

- A SPR biosensor for ErbB2 breast cancer biomarker has been developed.
- Amplification with gold nanoparticles enhanced the sensitivity.
- A detection limit of 180 pg mL<sup>-1</sup> has been achieved in human serum.
- Raw lysates from model breast cancer cell lines have been successfully assayed.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 15 October 2015

Received in revised form

3 December 2015

Accepted 12 December 2015

Available online 18 December 2015

### Keywords:

Surface plasmon resonance (SPR)

ErbB2 biomarker

Biosensor

Gold nanoparticles

Serum

Cell lysates

## ABSTRACT

A highly sensitive surface plasmon resonance (SPR) immunosensor for the important ErbB2 breast cancer biomarker has been developed. Optimization of the assay has been carried out, including signal enhancement employing gold nanoparticles (GNPs). The effect of the signal amplification of the GNPs has been also studied. The assay has been tested with clinically relevant matrices. Results in 50% human serum yielded a LOD of 180 pg mL<sup>-1</sup> which is a concentration 83 times lower than the clinical cut-off. Raw lysates from model breast cancer cell lines (SK-BR-3, MCF-7 and MDA-MB-436) have been also assayed and higher quantities of the ErbB2 protein were clearly observed in the ErbB2 over-expressing case (SK-BR-3). The results confirmed that the simple and highly sensitive SPR immunosensor represents a feasible tool for ErbB2 detection.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

ErbB2 or HER2 is a tyrosine kinase receptor belonging to the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and is involved in cellular signaling pathways, which lead to cell proliferation, growth, apoptosis and differentiation. These processes are essential

\* Corresponding author. IK4-Tekniker, Calle Iñaki Goenaga, 5 20600 Eibar, Gipuzkoa, Spain.

E-mail address: [josu.martinez@tekniker.es](mailto:josu.martinez@tekniker.es) (J. Martinez-Perdiguero).



to life, but loss of control within these pathways is frequently associated with several diseases, including cancer. Although the overexpression of ErbB2 is observed in some of breast cancer cases (thus cataloged as ErbB2 positive) and treatments using a monoclonal antibody to this molecule is now in use, it is only effective in patients with excess receptor levels. In fact, it is required to screen the patients before treatment to find those who are eligible for such administrations [1].

The ErbB2 protein is membrane-spanning, having both intracellular and extracellular domains. The extracellular domain (ECD) of ErbB2 can be cleaved by matrix metalloproteases and shed in the culture supernatant of certain breast cancer cell lines and in the serum of patients with breast cancer. This fragment of the intact ErbB2 protein is often termed p105, or soluble p105, as it represents the 105 kDa N-terminal fragment of the 185 kDa intact protein. The ECD is found at elevated levels in serum in approximately 50–60% of ErbB2 positive breast cancer patients. Further studies have shown increased levels of ErbB2 ECD in serum is associated with a poor prognosis, reduced therapeutic response and decreased survival chances [1,2]. All these findings have resulted in the use of ErbB2 or EDC as target analytes in the early detection of breast cancer. The blood ErbB2 ECD content of breast cancer patients is usually  $>15 \text{ ng mL}^{-1}$ , which requires assay methods capable to reliably measure such low concentration levels in this complex biological sample.

Current diagnostic tests for ErbB2 involve the use of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) or immunohistochemistry (IHC), which are optical semi-quantitative techniques. Moreover, both procedures are complicated and time consuming, demand elaborated sample preparations and require specially trained personnel to carry out the corresponding multi-step procedures [1].

A new generation of biosensors using optical, piezoelectric or electrochemical transduction principles are being developed [3]. Among them, surface plasmon resonance stands out as a highly sensitive optical detection method offering several advantages. SPR sensors sense very small changes in the refractive index on the gold surface of a chip [4,5]. The adequate and specific functionalization of this surface allows for quantification of analytes as the refractive index continuously changes upon binding. This permits a highly sensitive monitoring of the binding process in a real-time and label-free fashion. This technique is commonly used in many laboratories mainly for molecular recognition kinetics characterization or screening experiments with proteins, drugs or DNA. The use of SPR biosensors for protein determination is somehow less explored, mainly due to the problems arising from non-specific binding (NSB) when working with clinically-relevant complex samples such as serum, urine, saliva, etc. This problem can be overcome by employing different strategies such as the use of optimized sample dilution solutions to hinder NSB [6–10] or employing sandwich assays that provide the necessary selectivity for detection [7,8,11,12]. Despite these promising features only one SPR biosensor involving a direct assay and the use of recombinant Protein G to assist in the orientation of a specific capture antibody has been reported for the determination of ErbB2 with a limit of detection (LOD) of  $11 \text{ ng mL}^{-1}$  [2]. However, weak molecular interactions and an uncommon negative SPR shift complicated the quantification.

In the present work we report the development of an SPR immunosensor for the quantification of ErbB2 protein using signal enhancement with GNPs. Assay parameters have been optimized and both human serum and raw cell lysate samples have been tested. The results proved that the simple and highly sensitive SPR immunosensor developed represents a feasible tool for real-time ErbB2 detection in these clinically relevant matrices.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and solutions

Human ErbB2/HER2 protein standards (10004-HCCH), capture mouse monoclonal antibodies (10004-MM03) and detection biotinylated antibodies (10004-H08H) were purchased from Sino Biological (Beijing, China). Mouse Immunoglobulin G (MIgG, ref. 015-000-003) and bovine serum albumin (BSA, ref. 001-000-161) were from Jackson ImmunoResearch Europe (Newmarket, UK). N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) and ethanolamine hydrochloride (ETA) were from Sierra Sensors GmbH (Hamburg, Germany). 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) and Tween 20 were from Sigma–Aldrich (Tres Cantos, Spain). For the tests in serum, pooled human serum was purchased also from Sigma–Aldrich (ref. H4522). Streptavidin decorated 20 and 40 nm gold nanoparticles (SAv-GNP, refs. BA.STP20 and BA.STP40, respectively) were obtained from British Biocell International (Cardiff, UK). The SAv-GNPs were used as received from the supplier (with an OD of 10.2 at 520 nm in the stock solution for both particle sizes).

The following buffer solutions were freshly prepared: phosphate-buffered saline pH 7.3 containing 0.05% (w/v) Tween 20 (PBST) and PBST supplemented with 0.2% (w/v) BSA (PBST-BSA), which was employed as running buffer throughout all experiments. The low detergent concentration was present to hinder the sticking of bubbles in the microfluidic channels, while BSA protein carried out a continuous blocking of all the surfaces. All other chemicals were of analytical grade and ultrapure water (Millipore Milli-Q) was used throughout.

### 2.2. Instrumentation

A SPR2 biosensor instrument from Sierra Sensors GmbH (Hamburg, Germany) was used for all experiment. The system is equipped with a continuous flow microfluidic sample delivery, an automated sample processing unit and accurate temperature control. The two spots in the microfluidic cell can be individually addressed via hydrodynamic focusing. By means of immobilizing a non-specific protein (MIgG) on the first spot (reference channel) and the specific capture antibody on the second one, real-time referencing was carried out. For all the experiments the temperature and flow rate of the SPR system were set to  $25^\circ\text{C}$  and  $25 \mu\text{L min}^{-1}$ , respectively. Glass prisms with a 50 nm-thick gold layer, also provided by Sierra Sensors, were used as sensor chips.

### 2.3. Ligand immobilization

A self-assembled monolayer (SAM) was created over the gold-coated sensor chips by immersion in 2.5 mM MUA ethanolic solution during 12 h. The chips were then gently rinsed with ethanol and water and dried under a nitrogen stream. Modified chips were stored at  $4^\circ\text{C}$  until use.

The biofunctionalization of the sensor chips was made by means of standard amine coupling with PBST running buffer. After docking a previously modified sensor chip in the SPR system, the carboxyl groups present in the MUA SAM were activated by a 200  $\mu\text{L}$  injection of a 200 mM EDC and 50 mM NHS 1:1 mixture solution. Subsequently, 200  $\mu\text{L}$  of a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  mouse monoclonal anti-ErbB2 solution (prepared in 10 mM pH 5.5 sodium acetate) were injected in the active spot and 200  $\mu\text{L}$  of  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  MIgG (prepared in 10 mM pH 6.0 sodium acetate solution) in the reference spot. In order to block all the remaining unreacted NHS-ester groups and



avoid any undesired non-specific binding (NSB), a 200  $\mu\text{L}$  injection of 1 M ETA solution (pH 8.5) was carried over the two functionalized spots.

#### 2.4. Sample preparation

The ErbB2 standard solutions were prepared in the SPR system running buffer (PBST-BSA). The pooled human serum was diluted to 50% in a special solution prepared to hinder NSB which, after optimization, consisted of running buffer supplemented with 4 M NaCl and 0.1% (w/v) Tween 20.

MCF-7, MDA-MB-436 and SK-BR-3 breast cancer cell lines were grown according to established protocols in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin, and 2.5 mM L-glutamine (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) [13]. To lyse the cells, they were washed with cold PBS, incubated for 5 min with PBS 4 mM EDTA to detach them from the plates, centrifuged at 1200 rpm to remove PBS 4 mM EDTA, and disrupted by the addition of 1 mL of cold lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 1X protease inhibitor cocktail, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM activated sodium orthovanadate. Then, cells were incubated on ice for 10 min, passed through a 25 gauge needle attached on a 1 mL syringe 10 times and transferred to a microcentrifuge tube. The cell lysate was then clarified by centrifuging at 13,200 rpm at 4 °C for 15 min. Total protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and the lysates stored at -80 °C until further use. For the SPR experiments, the lysates were further diluted in the mentioned lysis buffer.

#### 2.5. ErbB2 SPR immunosensor

Two different approaches were used in the SPR immunosensor: a direct-binding label-free assay and a sandwich format including GNP amplification. 200  $\mu\text{L}$  (8 min contact time) of the samples were injected over both the active and reference channels (functionalized with anti-ErbB2 and MlgG, respectively). This gave rise to measurable signals down to a point where signal amplification was necessary. Enhancement was achieved by subsequent 75  $\mu\text{L}$  injections of a 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  biotinylated anti-ErbB2 and a 20 times diluted SAv-GNPs (40 nm) solutions, respectively.

Surface regeneration was successfully carried out with a 25  $\mu\text{L}$  injection of a 100 mM HCl solution which virtually removed all the bound protein without damaging the immobilized antibody layer. The activity of the chip was checked to be intact during at least 300 cycles.

In all cases, a minimum of two replicates were carried out for each sample. The samples were injected in the system in randomized order to avoid potential memory effects. Blank samples were also injected in order to perform double referencing [14]. Data was analyzed using Tracedrawer software (v. 1.3, Ridgeview Instruments AB, Uppsala, Sweden).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Sensor surface biofunctionalization

Unlike for biomolecular binding kinetic studies, for pure detection purposes surfaces with very high ligand densities are usually preferred to obtain optimum analyte capture capacities. Typically, carboxymethylated dextran hydrogel modified chips are employed in SPR systems because of 3D-like structure and high

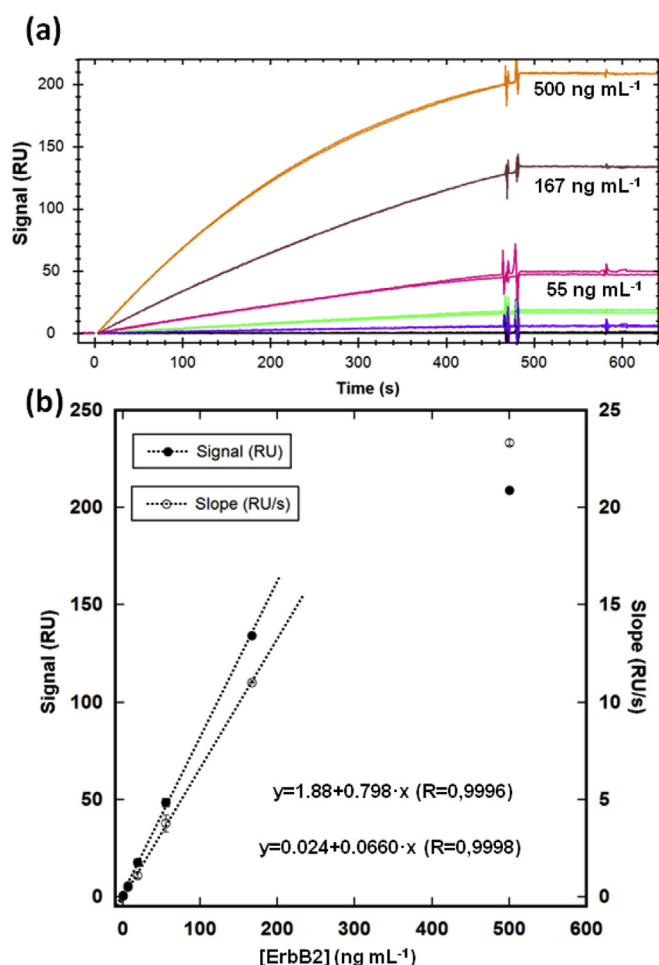
binding capacity. However, these chips do not perform as well when assaying in complex matrices such as serum [15]. In this work the chip gold surfaces were modified with MUA SAMs and standard amine protein coupling [5]. The protein preconcentration solutions were prepared in sodium acetate buffers because of its low ionic strength. To maximize their electrostatic preconcentration over the surface during injection, pH scouting optimization experiments on non-activated SAM surfaces were carried out in the pH 5–6 range for both antibodies (anti-ErbB2 and MlgG). The optimal solution pH for each one of the proteins was determined by measuring the slope of 15  $\mu\text{L}$  injections at each pH and resulted in pH 5.5 and 6.0 for anti-ErbB2 and MlgG, respectively. High antibody concentrations (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were employed to maximize surface coverage. As it can be seen in Fig. S1, the immobilization signal, saturated on both spots, was ca. 2200 RU.

For the rest of experiments, the running buffer was changed from PBST (used during the previous amine coupling routine) to PBST supplemented with BSA (see section 2.2). The fluidics of the SPR system was primed with this new buffer and the baseline stabilized in less than 2 min. The activity of the anti-ErbB2 antibodies was checked by repeatedly injecting 25  $\mu\text{L}$  of 200  $\text{ng mL}^{-1}$  ErbB2 standard solutions (prepared in running buffer) and regenerating the surface. Several regeneration solutions were tested (10–100 mM pH 1.5–3 glycine and 10–100 mM HCl solutions). The best results were obtained with 100 mM HCl, which demonstrated full regeneration of the sensor surface without reducing the binding activity of the immobilized antibodies during more than 400 regeneration cycles. This fact was checked by periodically performing the mentioned activity tests during the lifetime of the sensor chip (see Fig. S2).

#### 3.2. Immunosensor optimization

A label-free direct-binding immunosensor is the simplest and most logic first approach in any SPR immunosensor development. With this objective, simple 8 min-long (200  $\mu\text{L}$ ) injections of ErbB2 standard solutions with concentrations ranging from 500 down to 6.2  $\text{ng mL}^{-1}$  (3-fold dilutions) and blank samples were carried out. Fig. 1a shows the obtained sensorgrams which display a strongly mass transport limited binding which only faded at the highest concentration. This proves the high binding capacity of the prepared chip surface and its suitability for determination experiments. In Fig. 1b the calibration curves obtained from the end-of-injection signal and from the initial slope of the binding (first 15 s) are shown. As expected, the behavior is highly linear. A LOD of 3.8  $\text{ng mL}^{-1}$  was calculated as the concentration corresponding to a signal of 3 times the standard deviation of 3 blank samples. From the sensorgrams displayed in Fig. 1a it can be clearly stated that longer contact times would give rise to improved LODs, however a sample volume of 200  $\mu\text{L}$  was considered as a top limit due to practical reasons of sample availability.

The obtained LOD is well below the clinical cut-off value of 15  $\text{ng mL}^{-1}$  of this biomarker in human serum [16] so we proceeded to perform assays in real human serum. The use of pure or even diluted serum in label-free immunosensors is a difficult task because of the complex nature of the samples and the consequent high NSB. According to the literature, the use of special NSB hindering buffers has proved effective with SPR biosensors (see, e.g., [6–9,17]) For the ErbB2 immunosensor, we optimized a special solution using a cocktail approach [18] with varying concentrations of Tween 20 detergent, NaCl and BSA. The largest effect was attributed to the NaCl content that reduced the electrostatic interaction between proteins in the serum and the sensor surface. A solution of 4 M NaCl, 0.1% Tween 20 in PBS offered the best results,



**Fig. 1.** a) Direct ErbB2 binding sensorgrams 8 min-long (200  $\mu$ L) injections of ErbB2 standards with concentrations ranging from 500 down to 6.2 ng mL<sup>-1</sup> (3-fold dilutions) and blank samples. The sensor surface was regenerated after each cycle with a 25  $\mu$ L injection of 100 mM HCl. The sensorgrams have been double-referenced. b) Calibration curves obtained from the end-of-injection signal (t = 500 s) and from the initial slope of the binding (first 15 s). The linear fits have been obtained excluding the highest concentration point which suffered from surface saturation. Error bars are estimated as a triple of the standard deviation (n = 3). RU, response units.

with a ca. 85% reduction of the NSB. Using this special buffer, a qualitative detection of the ErbB2 analyte at very high concentrations ( $\sim 20 \mu$ g mL<sup>-1</sup>) was observed when comparing the signals from the active and reference sensor spots. Unfortunately, quantification was not possible due to the non-negligible high remnant NSB signal.

In order to enhance the sensitivity of the assay in human serum a sandwich immunosensor was optimized utilizing a secondary anti-ErbB2 (biotinylated) antibody and SAV-GNPs. Although the label-free character of the assay was lost, this approach is expected to enhance the selectivity (due to sequential specific binding of high affinity antibodies and SAV-GNPs) as well as the sensitivity (due to signal amplification provided by the antibodies and the bulky GNP).

Optimization of the required steps to complete the sandwich assay was carried out. Fig. S3 shows the signal stemming from assays carried out at increasing concentrations of the secondary antibody (from 2 up to 16  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) with a fixed 4 ng mL<sup>-1</sup> antigen concentration. As it can be seen, the largest increase occurs between 2 and 4  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, with a close to linear behavior at larger

concentrations. It has to be mentioned that these secondary antibodies are the most expensive consumable of the assay and a compromise between cost and performance had to be reached. Taking this into account, injections of biotinylated anti-ErbB2 were carried out at 4  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (75  $\mu$ L). The size and concentration of the SAV-GNP were also optimized. Fig. S4 shows the signals stemming from two folds dilutions of the 20 and 40 nm SAV-GNP stock solutions (from 1:5 down to 1:40). As it can be seen, the signals for both the 20 and 40 nm diameters saturated at a 1:20 dilution ratio while the signal of the largest nanoparticles (40 nm) doubled the signal of the 20 nm nanoparticles. In the view of this results, for GNP signal enhancement the 40 nm SAV-GNP were used.

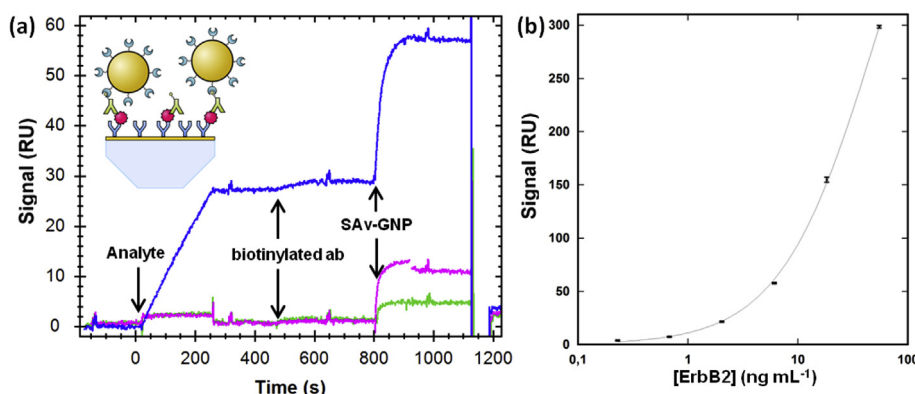
Fig. 2a shows whole sensorgrams for the developed double sandwich amplification immunosensor in ErbB2 standard solutions of three different concentrations (0, 0.68 and 6.11 ng mL<sup>-1</sup>). As it can be seen, at the highest concentration, the signal after the analyte injection was measurable and, for detection, amplification was not necessary (curve blue in Fig. 2a). However, when the analyte concentration was lowered to 0.68 ng mL<sup>-1</sup>, the direct binding signal did not stand out of baseline (curve pink in Fig. 2a), making the following two amplification steps necessary (with secondary antibodies and GNP). The sensorgram at null analyte concentration proved the high specificity of the sandwich format. A full calibration curve in the 0.23–55 ng mL<sup>-1</sup> concentration range was obtained as shown in Fig. 2b. It is worth noting that the binding information is in fact contained in the signal arising from the last amplification injection with GNPs which are logically proportional to the amount of bound ErbB2. This allows for quantification even in cases when there is non-negligible NSB during the sample injection. The sensorgrams for the GNP signals were referenced and are shown in Fig. S5. From these signals, a LOD of 180 pg mL<sup>-1</sup> was calculated. This value is 20 times lower than that of the direct binding assay proving the high effectiveness of the amplification steps. A fit to a simple 1:1 biomolecular binding model was also carried with an effective equilibrium constant  $K_D = 260 \pm 20$  pM which confirmed the high affinity of the employed antibodies.

At this point, it is worth comparing the results of the direct binding and the GNP-amplified assays. In Fig. 3, a comparison of the performance of both formats (at the concentrations where the direct binding assay gave measurable signals) is shown as well as data of the amplification factor provided by the GNPs amplification-based strategy. As it can be seen, the amplification factor increases with decreasing analyte concentrations (up to more than 10 at 6.11 ng mL<sup>-1</sup>). Below this concentration a direct comparison cannot be established, however, as mentioned above, the LOD was reduced 20 times which could give an idea of signal enhancement achieved. It is also interesting to mention that in the absence of ErbB2, no signal was measured even after the amplification steps, which demonstrated the total absence of NSB in the enhanced assay.

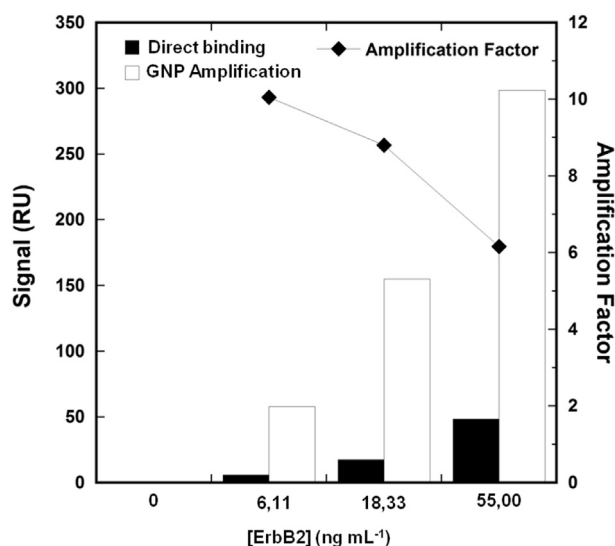
Compared with the only SRP biosensor reported so far for ErbB2 determination [2], the LOD is about 3 and 60 times lower using the direct and the SAV-GNP-based sandwich strategies developed in this work (3.8 ng mL<sup>-1</sup> and 190 pg mL<sup>-1</sup>, respectively, vs. 11 ng mL<sup>-1</sup>). This better sensitivity is particularly relevant when working with valuable but scarce biological samples.

### 3.3. Serum samples

The developed SPR ErbB2 sandwich immunosensor was applied to the determination of ErbB2 in spiked human serum samples using the special sample dilution buffer mentioned above. The samples were diluted to 50% in this buffer and injected in the SPR system (200  $\mu$ L aliquots). The sensorgrams obtained for the GNP



**Fig. 2.** a) Sensorgrams obtained using the double sandwich amplification immunosensor for three different standard ErbB2 solutions (0, 0.68 and 6.11 ng mL<sup>-1</sup>) prepared in buffer. The inset shows a sketch of the GNPs-amplified sandwich immunoassay on the surface of the gold chip. b) Calibration curve obtained for ErbB2 standard solutions in the 0.23–55 ng mL<sup>-1</sup> concentration range and fit to a 1:1 molecular interaction model. Error bars are estimated as a triple of the standard deviation ( $n = 3$ ). RU, response units.

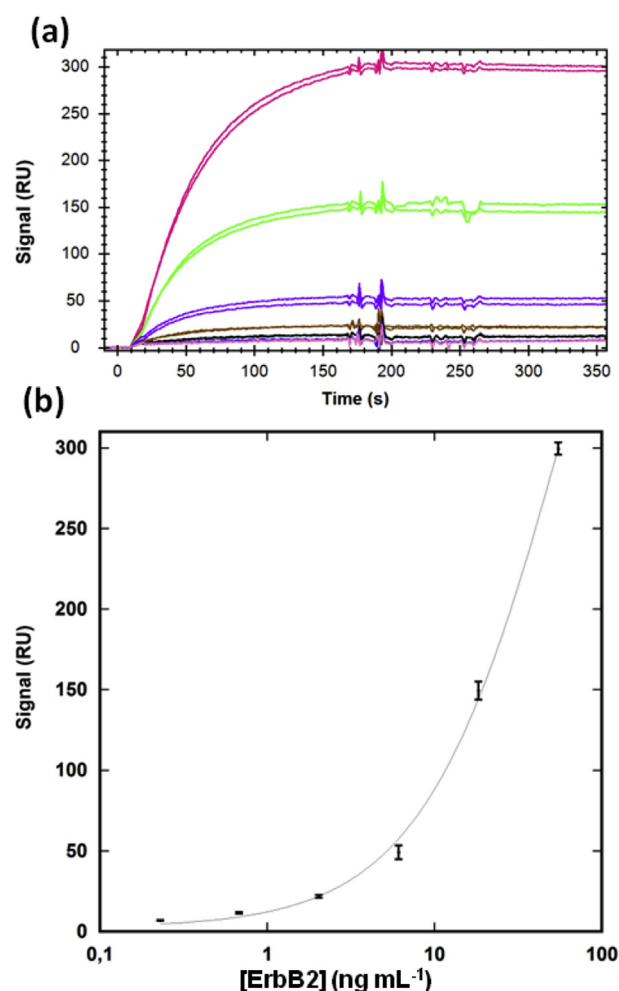


**Fig. 3.** Comparison of the performance of the direct binding and sandwich assays (enhanced with SAV-GNPs). The amplification factor (i.e. signal/blank ratio) is also shown at each concentration, except at null ErbB2 concentration.

amplification step with duplicates of decreasing concentrations of ErbB2 (from 55 down to 0.23 ng mL<sup>-1</sup>) are shown in Fig. 4a. As it can be seen, non-spiked serum samples resulted in null signals which demonstrated the high selectivity of the developed assay. Again, using only the signal stemming from the last amplification step with SAV-GNPs, the calibration curve of Fig. 4b was constructed. A LOD of 180 pg mL<sup>-1</sup> was obtained, which is highly similar to that obtained with standard solutions. As before, a fit to 1:1 biomolecular binding model was carried out with a resulting effective equilibrium constant  $K_D = 340 \pm 70$  pM. Comparing these values in human serum with the ones obtained in standard solutions, it can be concluded that the matrix effects have been virtually removed. It has to be taken into account that, since a 50% dilution ratio was employed, the effective LOD for the serum samples is 360 pg mL<sup>-1</sup>, still 42 times lower than the commonly accepted clinical cut-off value (15 ng mL<sup>-1</sup>).

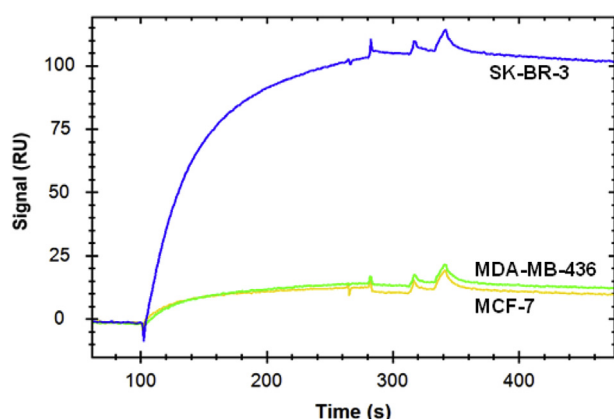
#### 3.4. Cell lysate samples

The good results obtained in serum motivated us to test the



**Fig. 4.** a) Double-referenced sensorgrams obtained for the SAV-GNP amplification step with the sandwich immunosensor format for non-spiked and spiked human serum samples (from 55 down to 0.23 ng mL<sup>-1</sup> ErbB2, 3-fold dilutions). b) Calibration curve obtained for 1:1 human serum samples spiked with increasing concentrations of ErbB2 and fit to a 1:1 molecular interaction model. Error bars are estimated as a triple of the standard deviation ( $n = 3$ ). RU, response units.

performance of the developed methodology in relevant raw cell lysates. With this objective, three different metastatic breast cancer



**Fig. 5.** Sensorgrams obtained for the SAV-GNP amplification step in the sandwich-type immunosensor format for different raw breast cancer cell lysate samples (at a final amount of 40  $\mu\text{g}$ ). RU, response units.

cell lines expressing varying levels of ErbB2 were selected: MDA-MB-436, SK-BR-3 and MCF-7. While MDA-MB-436 and MCF-7 breast carcinoma cell lines contain typical number of copies of the ErbB2 gene, SK-BR-3 cell line contains approximately 10-fold more copies of this gene, leading to a higher production of the ErbB2 protein [19].

To perform these experiments, 40  $\mu\text{g}$  of each raw lysate were diluted to a total volume of 200  $\mu\text{L}$  in lysis buffer and injected in triplicates over the functionalized gold chip. Fig. 5 shows the results obtained for the sandwich immunosensor (only SAV-GNP step shown). As it can be seen, ErbB2 protein was highly expressed in SK-BR-3 cells when compared to MCF-7 and MDA-MB-436 cells. The NSB binding of the raw cell lysates to the surface was low and, in any case, the matrix effect was overcome by the expected improved selectivity and demonstrated signal enhancement of the sandwich immunosensor. A calibration curve was simultaneously constructed with ErbB2 standard solutions (prepared in lysis buffer) to quantify the ErbB2 content of the lysates. The ErbB2 content of the positive SK-BR-3 cell line was estimated in  $230 \pm 10 \text{ ng } \mu\text{g}^{-1}$  (ng of ErbB2 per  $\mu\text{g}$  of lysate). For the MCF-7 and MDA-MB-436 lysates the content, in both cases, was of  $30 \pm 10 \text{ ng } \mu\text{g}^{-1}$ . These results are in the same order of magnitude than those determined by using an ErbB2 amperometric sandwich magnetosensor [13] and proved its potential applicability for ErbB2 testing not only in serum but also in other clinically relevant samples.

#### 4. Conclusions

A sensitive and effective SPR approach that allows real-time biosensing of low concentrations of ErbB2 in serum samples and raw cell lysates has been presented. The combination of a sandwich format with the amplification power of GNPs significantly enhanced the sensitivity of the proposed immunosensor, which to the best of our knowledge is the most sensitive SPR-based biosensor for ErbB2 determination reported so far with a LOD of  $180 \text{ pg mL}^{-1}$  in 50% human serum. The results showed that the method is simple and sensitive enough for the determination of ErbB2 in serum samples (far below the clinical cut-off) and raw cell lysates from breast cancer cells with good reproducibility and accuracy.

This SPR-based immunosensor provides a convenient, sensitive and specific method for protein detection and represents a potential versatile tool for highly sensitive clinical analysis and other

biotechnology applications and a viable alternative for use in clinical laboratories.

#### Acknowledgments

This work was supported by Gobierno Vasco, Dpto. Industria, Innovación, Comercio y Turismo under the Ertortek 2013 Grant No. IE14-391. The financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Project, CTQ2012-34238, and the NANOAVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2013/MT-3029) are gratefully acknowledged. Rodrigo Barderas is supported by the Ramón y Cajal Programme of the MINECO.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.020>.

#### References

- [1] E. Arkan, R. Saber, Z. Karimi, M. Shamsipur, A novel antibody-antigen based impedimetric immunosensor for low level detection of HER2 in serum samples of breast cancer patients via modification of a gold nanoparticles decorated multiwall carbon nanotube-ionic liquid electrode, *Anal. Chim. Acta* 874 (2015) 66–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.022>.
- [2] V.S. Martin, B.A. Sullivan, K. Walker, H. Hawk, B.P. Sullivan, L.J. Noe, Surface Plasmon Resonance Investigations of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, *Appl. Spectrosc.* 60 (2006) 994–1003 doi: [dx.doi.org/10.1366/000370206778397498](http://dx.doi.org/10.1366/000370206778397498).
- [3] A.P.F. Turner, Biosensors: sense and sensibility, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3184, <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs35528d>.
- [4] J. Homola, *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. Surface Plasmon Resonance Sensors*, Springer-Verlag, Berlin, 2006.
- [5] M.A. Cooper, *Label-free Biosensors. Techniques and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, 2009.
- [6] J. Treviño, A. Calle, J.M. Rodríguez-Frade, M. Mellado, L.M. Lechuga, Determination of human growth hormone in human serum samples by surface plasmon resonance immunoassay, *Talanta* 78 (2009) 1011–1016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.012>.
- [7] J. Martínez-Perdiguero, A. Retolaza, L. Bujanda, S. Merino, Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF $\alpha$  biomarker in human serum, *Talanta* 119 (2014) 492–497, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.063>.
- [8] Y. Uludag, I.E. Tothill, Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5898–5904, <http://dx.doi.org/10.1021/ac300278p>.
- [9] C. Ayela, F. Roquet, L. Valera, C. Granier, L. Nicu, M. Pugnère, Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D. A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 3113–3119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2007.01.020>.
- [10] D. Tyagi, J.B. Perez, A. Nand, C. Zhiqiang, P. Wang, J. Na, et al., Detection of embryonic stem cell lysate biomarkers by surface plasmon resonance with reduced nonspecific adsorption, *Anal. Biochem.* 471 (2015) 29–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2014.11.001>.
- [11] M. Pawula, Z. Altintas, I.E. Tothill, SPR detection of cardiac troponin T for acute myocardial infarction, *Talanta* 1–8 (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.006>.
- [12] R. Li, F. Feng, Z.-Z. Chen, Y.-F. Bai, F.-F. Guo, F.-Y. Wu, et al., Sensitive detection of carcinoembryonic antigen using surface plasmon resonance biosensor with gold nanoparticles signal amplification, *Talanta* 140 (2015) 143–149, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.041>.
- [13] U. Elettigerra, J. Martínez-Perdiguero, S. Merino, R. Barderas, R.M. Torrente-Rodríguez, R. Villalonga, et al., Amperometric magnetosensor for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum, cell lysates and intact breast cancer cells, *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 34–41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.017>.
- [14] D.G. Myszk, Improving biosensor analysis, *J. Mol. Recognit.* 12 (2000) 279–284 doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199909/10)12:5<279::AID-JMR473>3.0.CO;2-3.
- [15] J.-F. Masson, T.M. Battaglia, J. Cramer, S. Beaudoin, M. Sierks, K.S. Booksh, Reduction of nonspecific protein binding on surface plasmon resonance biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1951–1959, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0834-2>.
- [16] W.P. Carney, D. Bernhardt, B. Jasani, Circulating HER2 Extracellular Domain: A Specific and Quantitative Biomarker of Prognostic Value in all Breast Cancer Patients? *Biomark. Cancer* 5 (2013) 31–39, <http://dx.doi.org/10.4137/BIC.512389>.
- [17] C. Situ, A.R.G. Wylie, A. Douglas, C.T. Elliott, Reduction of severe bovine serum



- associated matrix effects on carboxymethylated dextran coated biosensor surfaces, *Talanta* 76 (2008) 832–836, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.053>.
- [18] N.J. de Mol, M.J.E. Fischer (Eds.), *Springer Protocols. Methods in Molecular Biology* 627. Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols, Humana Press, 2010.
- [19] Y. Xiao, X. Gao, S. Maragh, W.G. Telford, a Tona, Cell Lines as Candidate Reference Materials for Quality Control of ERBB2 Amplification and Expression Assays in Breast Cancer, *Clin. Chem.* 55 (2009) 1307–1315, <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.120576>.



# Estrogen receptor $\alpha$ determination in serum, cell lysates and breast cancer cells using an amperometric magnetosensing platform



U. Eletxigerra<sup>a,\*</sup>, J. Martinez-Perdiguerro<sup>a,\*</sup>, S. Merino<sup>a</sup>, R. Barderas<sup>b</sup>, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel<sup>c</sup>, R. Villalonga<sup>c</sup>, J.M. Pingarrón<sup>c</sup>, S. Campuzano<sup>c,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Micro-NanoFabrication Unit, IK4-Tekniker, Eibar, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 November 2015

Received in revised form 7 January 2016

Accepted 8 January 2016

Available online xxx

### Keywords:

Magnetosensing

Amperometry

ER $\alpha$

Lysates

Intact cancer cells

Breast cancer

## ABSTRACT

An electrochemical magnetosensing platform for the determination of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) protein in complex samples (serum and cell lysates) able to discriminate between ER $\alpha$  positive and negative breast cancer cells is reported. Specifically functionalized magnetic microbeads with sandwich immunocomplexes and amperometric detection at disposable screen-printed carbon electrodes (SPCEs) resulted in highly selective and sensitive ER $\alpha$  detection with a detection limit of 19 pg mL<sup>-1</sup>. This magnetosensing platform was successfully applied to the quantitation of ER $\alpha$  in spiked human serum and cell lysates samples without any matrix effect with an advantageous performance in terms of simplicity and assay times over commercial ELISA assays. The biosensor capability for assessing ER $\alpha$  in intact breast cancer cells makes it competitive with conventional strategies providing rapidly quantitative and reliable results on this relevant biomarker currently used in the clinical practice for diagnosis, follow-up and monitoring of metastatic breast cancer.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women worldwide, with nearly 1.4 million new cases annually and the leading cause of cancer death despite the huge progress in treatment [9,25]. Numerous evidences have highlighted the importance of the estrogen receptor (ER) in the progression and invasion of breast cancer cells [28]. Indeed, approximately 70% of new diagnosed breast cancers are ER positive [8].

Estrogen is a hormone playing important roles during mammary gland development but also in the development, risk, and treatment of breast cancer. It mediates its function by binding to and activating both isoforms of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ , respectively) in both, membrane and cytoplasm, producing their translocation to nucleus, where ER $\alpha$ , and ER $\beta$  are ligand-dependent transcription factors and regulate specific target genes [12]. ER $\alpha$  is the only isoform detectable by immunohistochemistry in breast cancer biopsies and is the

predominant subtype expressed in breast tumor tissues. Moreover, recent findings suggest that this steroid receptor transcription factor plays an important role in the biology of breast cancer and drives the proliferation of breast cancer cells [27]. Furthermore, ER $\alpha$  levels in breast tumor samples are highly predictive of a patient's response to hormonal therapy [5]. Since ER $\alpha$  is rarely determined in normal breast tissue from women without breast carcinoma and its levels and distribution in biopsies of breast carcinomas are influenced by the age and menopausal status of the patient, well-documented reference ranges are not available [6]. However, a number of biochemical studies have found values of 10 fmol mg<sup>-1</sup> protein extract (by ligand binding assays) or 15 fmol mg<sup>-1</sup> protein (by enzyme immunoassays), to discriminate between positive and negative ER tissues [13]. Regarding the serum ER $\alpha$  levels, although clinically significant cut-off values to discriminate between receptor-positive and -negative breast cancer and their prognostic value have not yet been established, Widschwendter et al. [24] found, in a study with 182 breast cancer patients and 188 age-matched controls, that serum ER $\alpha$  bioactivity was associated with the presence of breast cancer and that women with  $\geq 42.1$  pg mL<sup>-1</sup> serum ER $\alpha$  bioactivity had a 2.47-fold risk for breast cancer and 2.70-fold risk for ER-positive breast cancer, respectively. As a result, ER $\alpha$  has been regarded as the most informative valuable marker for the diagnosis and prognosis of breast cancer. Accordingly, the development of new methods for ER $\alpha$  determination together with other breast cancer-

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author. Tel.: +676339851; fax: +34 91 394 29.

E-mail addresses: [unai.eletxigerra@tekniker.es](mailto:unai.eletxigerra@tekniker.es) (U. Eletxigerra), [jmartinez@cicmicrogune.es](mailto:jmartinez@cicmicrogune.es) (J. Martinez-Perdiguerro), [santos.merino@tekniker.es](mailto:santos.merino@tekniker.es) (S. Merino), [rbarderas@quim.ucm.es](mailto:rbarderas@quim.ucm.es) (R. Barderas), [victor\\_lega90@hotmail.com](mailto:victor_lega90@hotmail.com) (V. Ruiz-Valdepeñas Montiel), [rvillalonga@quim.ucm.es](mailto:rvillalonga@quim.ucm.es) (R. Villalonga), [pingarro@quim.ucm.es](mailto:pingarro@quim.ucm.es) (J.M. Pingarrón), [susanacr@quim.ucm.es](mailto:susanacr@quim.ucm.es) (S. Campuzano).

associated receptors would benefit the diagnosis and prognosis of breast cancer patients, allowing their stratification in well-defined groups of risk for guided and personalized treatment [16,27].

Traditional methods for the detection of ER $\alpha$  include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [22], Western blotting [4] and immunohistochemistry [11]. Nevertheless, these methods usually present some shortcomings. For example, immunohistochemistry and Western blotting provide typically semiquantitative results [19,23] while ELISA can produce quantitative data but is time-consuming and expensive [27].

Electrochemical biosensors represent a clear current alternative to conventional methods in the clinical field because of their simplicity of use and inherent high selectivity and sensitivity. Moreover, they are able to provide accurate quantitative determinations using cost-effective instrumentation with pocket-size dimensions, ideal for integration in *point-of-care* (POC) devices [1,14]. Despite these excellent features only one electrochemical DNA sensor has been reported for the determination of ER $\alpha$  [27]. This biosensor involves the protection of DNA duplex from Exonuclease III (Exo III)-mediated digestion by specific binding of ER $\alpha$  to its DNA response elements and allowed quantification of ER $\alpha$  in the concentration range of 0.5 to 100 nM with a detection limit of 0.38 nM (25.1 ng mL<sup>-1</sup>). The electrochemical DNA sensor was applied to interrogate the ER $\alpha$  levels in nuclear extracts from different breast cancer cell lines but the electrode surface modification protocol was long (16.5 h) and the total assay time took 19 h [27,28]. To the best of our knowledge, no electrochemical immunosensor has been so far reported for the determination of ER $\alpha$ . This paper describes the first electrochemical immunosensor for the selective and sensitive determination of this clinically relevant biomarker. The proposed design implies the use of functionalized magnetic beads (MBs) which have demonstrated to constitute powerful tools to construct electrochemical immunosensors contributing to improve their bioanalytical performance in terms of sensitivity, reduced assay time and minimization of matrix effects which are essential to perform determinations in complex matrices [20,26]. In this particular case, the developed magnetoimmunosensor involves a sandwich configuration using two sheep anti-human ER $\alpha$  antibodies. The capture antibody was immobilized onto carboxylic acid-modified magnetic beads (HOOC-MBs) whereas the biotinylated detector antibody was labeled with a streptavidin-HRP conjugate. The electrochemical monitoring of the affinity reactions was carried out by amperometry at disposable screen-printed carbon electrodes (SPCEs) using hydroquinone (HQ) as electron transfer mediator and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as HRP substrate. The applicability of the developed disposable magnetoimmunosensor was evaluated by determining the target ER $\alpha$  protein in cell lysates and spiked human serum as well as by *in vitro* monitoring of the ER $\alpha$  status receptor in cancer cells. With the merits of simplicity, quick response, high sensitivity, easy operation and low cost, the proposed method can overcome disadvantages of traditional methods and may have a positive impact in the diagnosis and follow-up of breast cancer.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Apparatus and electrodes

All electrochemical measurements were carried out in a  $\mu$ STAT400 bipotentiostat/galvanostat from DropSens S.L. (Spain). Screen-printed carbon electrodes (SPCEs) consisting of a 4 mm-diameter carbon working electrode (WE), a carbon counter electrode (CE) and a silver pseudo-reference electrode (RE) (Ref. DRP-C110) and the specific cable connector (Ref. DRP-CAC) which acted as interface between the SPCEs and the potentiostat were also supplied by Dropsens S.L. A DynaMag-2 Magnet from Invitrogen (Spain) and a MixMate microtube mixer from Eppendorf (Germany) were employed for the magnetic separation and incubation of the MBs. A neodymium permanent magnet (diameter 4 mm) from AimanGZ (Spain) was integrated in a

custom-made poly(methyl methacrylate) dock to capture the MBs over the WE surface (see Fig. 1).

### 2.2. Reagents and solutions

Recombinant human ER $\alpha$ , sheep anti-human ER $\alpha$  (antiER $\alpha$ ) and biotinylated sheep anti-human ER $\alpha$  (biotin-antiER $\alpha$ ) were obtained from a Human Total ER $\alpha$ /NR3A1 DuoSet IC ELISA kit from R&D Systems Inc. (Ref: DYCS715, Minneapolis, United States). Recombinant human progesterone receptor (PR) was obtained from Human Total Progesterone R/NR3C3 DuoSet IC ELISA kit from R&D Systems Inc. (Ref: DYCS415, Minneapolis, United States), recombinant human ErbB2 protein was used from the ELISA Kit (ref. SEKA10004, Sino Biological Inc., China) and recombinant human TNF $\alpha$  protein was purchased from PeproTech (Ref. AF-300-01 A, United Kingdom).

Bovine serum albumin (BSA) and streptavidin conjugated HRP enzymatic label (SAV-HRP) were from Jackson ImmunoResearch (Refs. 001000-161 and 016-030-084, respectively, United Kingdom). Pooled human serum was purchased from Sigma-Aldrich (Ref: H4522, Spain). Carboxylic acid-modified MBs (Ref: HOOC-MBs, 2.8  $\mu$ m, 30 mg mL<sup>-1</sup> Dynabeads M-270 Carboxylic Acid) were bought from Invitrogen (Spain) and used as received.

N-hydroxysuccinimide (NHS), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), ethanolamine hydrochloride (ETA), hydroquinone (HQ) and Tween 20 were from Sigma-Aldrich (Spain). Sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), sodium chloride (NaCl) and potassium chloride (KCl) were purchased from Scharlau (Spain). Ethylenediamine Tetraacetate (EDTA) was from Fisher Bioreagents (Spain). All other chemicals were of analytical grade and ultrapure water (Millipore Milli-Q) was used throughout.

Several buffers were freshly prepared for the experiments: 0.01 M phosphate buffered saline at pH 7.5 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl (PBS); PBS supplemented with 1% (w/v) BSA; PBS containing 0.05% (w/v) Tween 20 (PBST); 50 mM MES buffer at pH 5.0; 50 mM phosphate buffer at pH 6.0 (PB) and 100 mM Tris-HCl buffer at pH 7.2.

Details about all the protocols used (MBs biofunctionalization and sandwich immunoassay, amperometric measurements and sample analysis) are described in detail in the Supporting information.

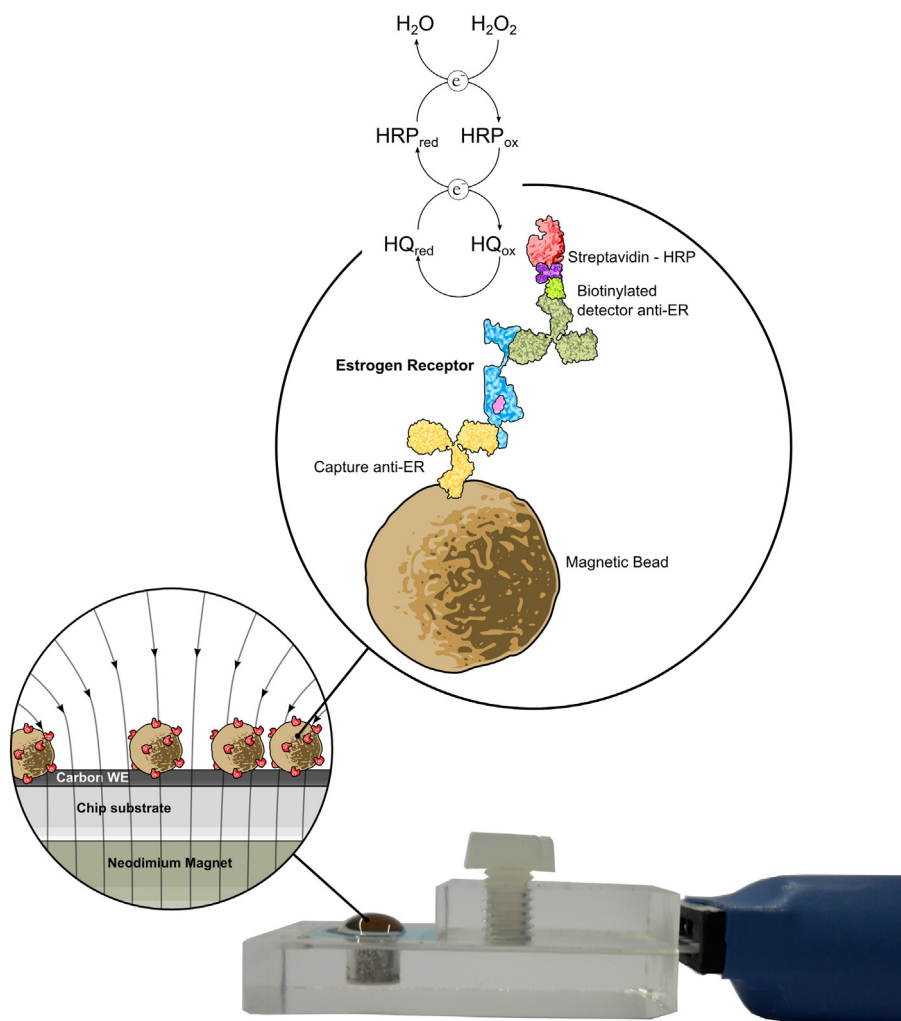
## 3. Results and discussion

The immunoassay fundamentals as well as the electrochemical reactions involved in the development of the magnetoimmunosensing platform for ER $\alpha$  biomarker determination are schematically displayed in Fig. 1. As can be observed, all the immunoreactions involved in the sandwich-type assay occurred on the MBs surface. After magnetically trapping the MBs bearing the immunoconjugates on the working electrode surface, amperometric detection of the HRP enzymatically catalyzed reduction current generated in the presence of the HQ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redox system was carried out.

### 3.1. Optimization of experimental variables

The experimental parameters involved in the magnetoimmunosensor preparation and functioning were optimized by taking the magnitude of the amperometric responses measured in the absence and in the presence of 1.0 ng mL<sup>-1</sup> ER $\alpha$  standards as criteria of selection for each variable.

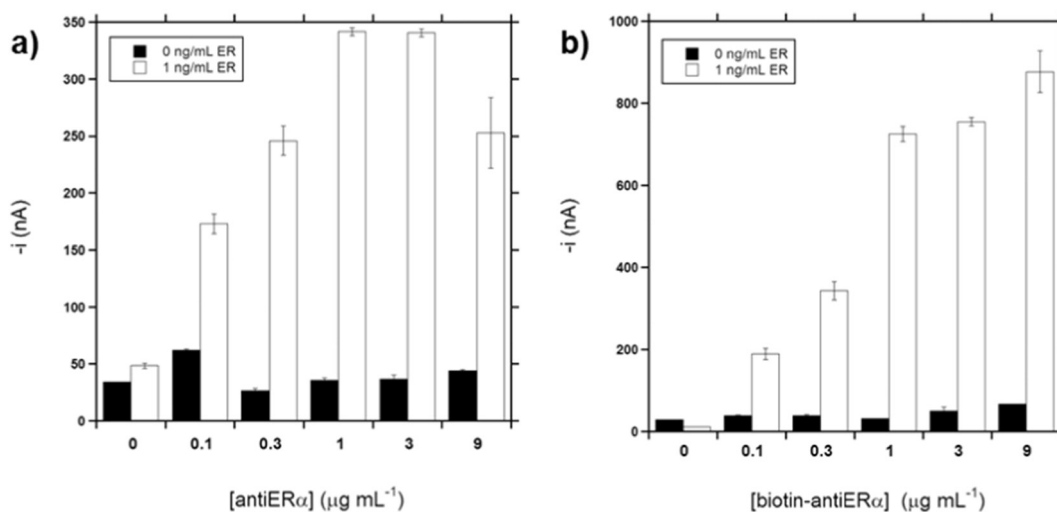
The primary antibody concentration was optimized by functionalizing HOOC-MBs as described in the section on biofunctionalization of MBs (in the Supporting Information) and sandwich immunoassay with primary antibody concentrations ranging from 0.0 to 9.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (3-fold serial dilutions). Fig. 2a shows that no major changes were observed for the



**Fig. 1.** SPCE inserted in the homemade poly(methyl methacrylate) dock with functionalized MBs on top of the working electrode together with the schematic representation of the sandwich magnetoimmunoassay and the reactions involved in the electrochemical detection.

amperometric signals obtained without ER $\alpha$ . However, the current measured in the presence of  $1.0 \text{ ng mL}^{-1}$  ER $\alpha$  increased significantly with the antiER $\alpha$  loading until  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  and then decreased which is most

likely due to the sterically hindered binding of the antigen when high amounts of capture antibody are immobilized [2]. In view of these results, a  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  capture antibody concentration was chosen as optimal.



**Fig. 2.** Dependence of the amperometric responses measured in the absence (black bars) and in the presence (white bars) of  $1.0 \text{ ng mL}^{-1}$  ER $\alpha$  solution with the capture antibody loading immobilized on COOH-MBs (a) and the biotinylated detector antibody concentration (b). Error bars estimated as a triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).



Regarding the detection antibody concentration, concentrations between 0.0 and 9.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were tested and results for ER $\alpha$  positive and negative standard solutions compared. As shown in Fig. 2b, while no significant current variations were produced in the absence of ER $\alpha$ , the amperometric response increased sharply with biotin-antiER $\alpha$  concentration up to 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and showed a much more moderate increase for larger concentrations in the presence of ER $\alpha$ . Accordingly, a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  detection antibody concentration was also selected for subsequent experiments.

With the aim of shortening the assay time as much as possible, the influence of the incubation time with the target protein was also evaluated. Four different incubation times were tested: 30, 60, 120 min and overnight (16 h). Fig. S1 shows that the larger the incubation time, the larger the obtained amperometric response, suggesting a somehow slow biomolecule binding. As a compromise between appropriate sensitivity and rapid methodology, a 60 min incubation time was chosen for further experiments. However, it is important to note that if higher sensitivities were required, longer incubation times could be used.

Furthermore, with the aim of simplifying as much as possible the whole assay protocol thus shortening the assay time, procedures involving different numbers of working steps were checked. These were: i) a step-by-step protocol implying three sequential incubations in the standard/sample (60 min), biotinylated detection antibody (60 min) and SAV-HRP (10 min) solutions; ii) a two-step assay involving a 60 min incubation in a mixture solution containing the target protein and the biotin-antiER $\alpha$ , followed by another 10 min incubation step in the SAV-HRP solution; iii) a one-step assay with just a 60 min incubation in a mixture solution containing all the bioreagents (target protein, biotin-antiER $\alpha$  and SAV-HRP). Fig. S2 shows that the conventional approach involving three independent incubation steps gave rise to noticeably better results. Conversely, simplified assays with one or two incubation steps, while offering quantifiable signals exhibited significantly reduced current responses. This effect can be attributed to the lower target recognition efficiency as a consequence of increased steric hindrance when all the immunoreagents were mixed in homogeneous solution or the target protein was incubated together with the biotin-antiER $\alpha$ . Accordingly, a 3-step protocol was employed for the implementation of the magnetoimmunosensor. However, it should be remarked that when sensitivity was not an issue, the one step protocol is able to provide results in only 30 min (once the anti-ER $\alpha$  were prepared).

Other experimental variables used, such as incubation times, detection potential and volume of MBs used per assay have been chosen according to optimization studies performed in our previous works [7,10].

### 3.2. Analytical characteristics

Under the selected experimental conditions, the calibration curve shown in Fig. S3 was constructed for ER $\alpha$  standards. A linear relationship ( $r = 0.990$ ) between the measured current and the ER $\alpha$  concentration was found over the 63–2000  $\text{pg mL}^{-1}$  range, with slope and intercept values of  $(0.27 \pm 0.01) \text{ nA mL pg}^{-1}$  and  $(20 \pm 10) \text{ nA}$ , respectively. The detection limit (LOD) and the determination limit (LQ), 19 and 63  $\text{pg mL}^{-1}$ , respectively, were calculated as the concentrations corresponding to signals three and ten times larger than the blank standard deviation ( $n = 10$ ), respectively. The reproducibility was evaluated by measuring 1.0  $\text{ng mL}^{-1}$  ER $\alpha$  standard solutions with 5 different magnetoimmunosensors prepared in the same manner. The low relative standard deviation (RSD) value obtained, 2.5%, indicated a great reproducibility of the whole magnetoimmunosensor fabrication and the signal transduction protocols.

### 3.3. Selectivity of the magnetoimmunosensor

To assess the specificity of the magnetoimmunosensor, cross-reactivity tests were carried out against different human non-target

proteins such as PR, ErbB2 and TNF $\alpha$ . Fig. S4 compares the signals provided by the magnetoimmunosensor for 0 and 500  $\text{pg mL}^{-1}$  ER $\alpha$  with those for relatively high concentrated solutions (10  $\text{ng mL}^{-1}$ ) of these non-target proteins. As can be deduced from the obtained results, no significant interference was apparent in any case even at the large concentrations assayed thus proving the selectivity of the developed magnetoimmunosensor.

### 3.4. Application to the determination of ER $\alpha$ in human serum and cell lysates

The validity of the developed methodology for clinical analysis was checked by analyzing spiked human serum samples. As stated in the section on application to the analysis of real samples (in the Supporting Information), serum samples were diluted down to 75% in PBS buffer containing 1% BSA. The possible existence of a matrix effect was tested by constructing a calibration plot from the serum diluted sample adequately spiked with growing amounts of the standard ER $\alpha$  solution up to 2000  $\text{pg mL}^{-1}$ . The slope value of the resulting linear calibration plot ( $r = 0.999$ ) was  $0.262 \pm 0.006 \text{ nA mL pg}^{-1}$ . This slope is statistically similar to that obtained with the buffered standard ER $\alpha$  solutions ( $0.27 \pm 0.01 \text{ nA mL pg}^{-1}$ ) and, therefore, it could be concluded that no significant matrix effect was apparent when working in scarcely diluted human serum samples. Accordingly, ER $\alpha$  quantification could be accomplished by simple interpolation of the measured current for the sample into the calibration plot constructed with ER $\alpha$  standards. The analysis of serum samples spiked with 500 and 2000  $\text{pg mL}^{-1}$  ER $\alpha$  yielded recoveries of  $(95 \pm 11)$  and  $(93 \pm 9)\%$ , respectively. These results further demonstrated the selectivity of the magnetoimmunosensor and its usefulness for the reliable determination of ER $\alpha$  at  $\text{pg mL}^{-1}$  levels in real human serum despite the complexity of these biological samples containing large amounts of other proteins such as BSA ( $\sim 50 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

The magnetoimmunosensor was also used as an *in situ* testing system to interrogate the ER $\alpha$  levels in lysates of cancer cell lines as a mimic of cancerous lysates. For this purpose, three different metastatic breast cancer cell lines expressing varying levels of ER $\alpha$  were assayed: MDA-MB-436, MCF-7 and SK-BR-3. Furthermore, the human primary pancreatic adenocarcinoma BxPC3 cell line was also checked as a control. It should be highlighted that these determinations are particularly challenging because of the high sensitivity required since the raw lysates include a small amount of the target protein together with many other cell components. Fig. 3 shows that the magnetoimmunosensor response was slightly different with respect to the blank for SK-BR-3 and MDA-MB-436 lysates while it was significantly larger for MCF-7 as expected considering ER $\alpha$  over-expression in the MCF-7 cell line [3]. No matrix effect was apparent for ER $\alpha$  determination when the lysate amount used was equal or lower than 2.5  $\mu\text{g}$ . Therefore, using 2.5  $\mu\text{g}$  of raw lysates, the target protein was determined by simple interpolation of the amperometric signals measured from the lysates into the calibration graph constructed with ER $\alpha$  standards. The obtained results are summarized in Table 1. In addition, they are compared with those provided by a commercial ELISA kit using the same immunoreagents. The hypothesis test carried out demonstrated the absence of statistically

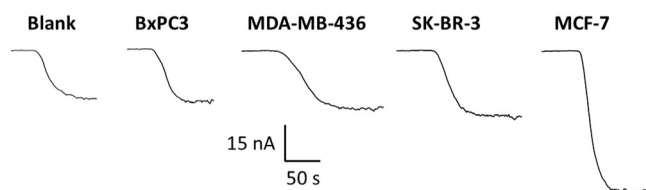


Fig. 3. Determination of ER $\alpha$  in cell lysates. Amperometric responses measured with the magnetoimmunosensor in the absence and in the presence of 2.5  $\mu\text{g}$  of cell lysates.

**Table 1**

Determination of the ER $\alpha$  (in pg  $\mu\text{g}^{-1}$ ) in cell lysates from different cancer cells with the developed amperometric magnetoimmunosensor and comparison with the results obtained by a commercial ELISA spectrophotometric kit. Data are presented in the form of: confidence interval (medium value  $\pm$  t.s./ $\sqrt{n}$ ) at the significance level 0.05; RSD value obtained for  $n = 3$ .

Cancer cell	ELISA	Magnetoimmunosensor
MCF-7	(21 $\pm$ 1); 2.0%	(22 $\pm$ 2); 3.6%
MDA-MB-436	(5 $\pm$ 1); 8.4%	(3.7 $\pm$ 0.8); 9.1%
SK-BR-3	(5.5 $\pm$ 0.8); 6.0%	(5 $\pm$ 1); 8.2%
BxPC3	(2.6 $\pm$ 0.6); 9.1%	(2.3 $\pm$ 0.4); 7.5%

significant differences between the mean values calculated for all the cell samples with both methods at the significance level 0.05.

In order to validate the results, cancer cell lysates were also analyzed by 10% SDS-PAGE with both Coomassie Blue staining and immunostaining to assess the presence of ER $\alpha$  in these preparations. As can be observed in Fig. S5, the target biomarker was noticeably overexpressed in the MCF-7 cells [3].

Moreover, it is worth mentioning that the ER $\alpha$  concentration measured in the MCF-7 lysates, (332  $\pm$  30) fmol  $\text{mg}^{-1}$ , is in agreement with those reported by other authors, 289.5 [21] and 285 fmol  $\text{mg}^{-1}$  [15]. These results demonstrated fairly well the usefulness of the approach to accurately determine the target protein content even in the presence of a large excess of other non-target cell components. In addition, it is important to remark that the great sensitivity of the magnetoimmunosensor allows useful amperometric responses to be obtained with only 2.5  $\mu\text{g}$  of ER $\alpha$ -overexpressing cells lysates in contrast with the 20–50  $\mu\text{g}$  required by conventional immunochemical assays such as Western blotting to detect the target protein. Moreover, the sensitivity demonstrated by the developed magnetoimmunosensor in these experiments, able to quantify accurately ER $\alpha$  ranges between 35 (BxPC3 cells) and 332 (MCF-7 cells) fmol  $\text{mg}^{-1}$  in cell lysates, demonstrated its potential for real applicability in clinical oncology since the average level of ER $\alpha$  in breast cancer is about 37 fmol  $\text{mg}^{-1}$  [18].

### 3.5. *In vitro* detection of ER $\alpha$ -overexpressing cells

The feasibility of the methodology for the *in vitro* monitoring of ER $\alpha$  status directly in the cancer cells was also explored. A significantly large response was obtained with the magnetoimmunosensor for the MCF-7 breast cancer cells, small responses were observed for the SK-BR-3 and MDA-MB-436 breast cancer cells, and a negligible response was obtained for the BxPC3 control cells. Fig. 4 compares the amperometric responses obtained for MCF-7 and MDA-MB-436 at two different cell densities thus demonstrating that the magnetoimmunosensor allowed for a clear discrimination between the ER $\alpha$  expression levels in both cell lines. These results demonstrate the good selectivity of the proposed sensor for the specific *in vitro* detection of ER $\alpha$ -overexpressing cancer cells. By interpolating the amperometric signals

obtained in these *in vitro* experiments into the ER $\alpha$  standard calibration curve, a rough estimation of the target protein amount and the number of ER $\alpha$  receptors per cell in the MCF-7 cells was possible. The results obtained of (0.27  $\pm$  0.06) fg  $\text{cell}^{-1}$  ER $\alpha$  protein and (2451  $\pm$  548) ER $\alpha$  receptors  $\text{cell}^{-1}$  are in good agreement with the number of ER $\alpha$ -receptors per cell estimated by Pawlak et al. of 2551  $\pm$  164 [17].

In order to demonstrate that the binding of antiER $\alpha$ -MBs to ER $\alpha$ -expressing cell lines is specific and based only on ER $\alpha$  expression, the antiER $\alpha$ -MBs were incubated with cultures from the different cell lines assayed following the protocol described in the section on application to the analysis of real samples (in the Supporting Information). After performing the described washing steps and just before incubating with the detector antibody, the modified MBs were examined with an optical microscope. Photomicrographs (representative pictures are shown in Fig. 5) demonstrated that no MDA-MB-436 and BxPC3 cells appeared attached to the MBs. Moreover, only one SK-BR-3 cell was visible while the MCF-7 sample showed numerous cells associated with the MBs. These observations are in agreement with the weak expression of ER $\alpha$  in BxPC3, SK-BR-3 and MDA-MB-436 cells and the high expression in MCF-7 cells.

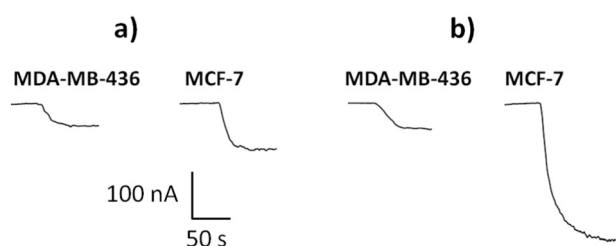
### 3.6. Comparison with other electrochemical approaches and commercial ELISA assays

Compared with the only electrochemical biosensor reported so far for ER $\alpha$  determination [27], the major advantages of the methodology reported in this work are the higher sensitivity and the much shorter time needed to perform the assay (5 vs 19 h). The achieved LOD is more than three orders of magnitude lower than that reported by Zhu et al. (19 pg  $\text{mL}^{-1}$  vs 25.1 ng  $\text{mL}^{-1}$ ). These advantages are particularly relevant in the clinical field, where a relatively short assay time is very attractive in order to implement a diagnostic tool able to provide reliable results in a few hours, and a better sensitivity is particularly relevant when working with valuable but scarce biological samples.

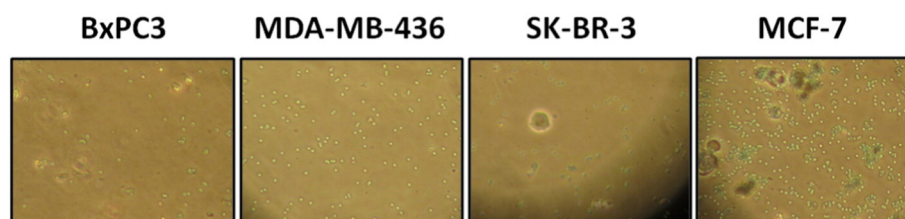
On the other hand, although achieving a similar sensitivity, the methodology developed with the electrochemical immunosensor is remarkably faster than that applied with commercial ELISA spectrophotometric kits. So, the whole detection process lasts about 2 h, while the commercial kit needs 4 h (once the antiER $\alpha$ -MBs and the antiER $\alpha$ -plate were prepared, respectively). Moreover, the spectrophotometric methods are difficult to be automated and hence hardly used *in situ*. Conversely, the use of the disposable immunosensors simplified largely the whole analytical procedure, requiring smaller sample volumes, and may be easily automated and performed with portable and cost-effective instrumentation which makes it a very attractive and user-friendly tool to perform decentralized analysis and be incorporated in the hospital routine. In this context, it is worth mentioning that the developed magnetoimmunosensor greatly simplifies the protocol particularly in the determination in intact cells, since it does not require seeding, quenching, fixing and permeabilization of the cells like the few commercial ELISAs recommended for this purpose.

## 4. Conclusions

In this work, the first electrochemical immunosensor for the determination of ER $\alpha$  protein is reported. The novel magnetoscaffold involves the use of a sandwich immunosensing configuration, HOOC-MBs and amperometric detection at SPCEs using the HQ/HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2$  system. The magnetoimmunosensor exhibits an excellent analytical performance in terms of sensitivity, selectivity and reliability of the measurements in complex biological samples. These attractive analytical characteristics, which bring relevant improvements with respect to commercial ELISA spectrophotometric kits in terms of simplicity and assay time, allow the accurate determination of ER $\alpha$  in spiked human serum and raw cell lysates. Moreover, this is the first time that an electrochemical biosensor is applied to monitor this hormonal receptor



**Fig. 4.** Assessment of ER $\alpha$  status of cancer cells by means of the developed magnetoimmunosensor. Amperometric responses measured in the presence of a) 12,500 and b) 62,500 cancer cells.



**Fig. 5.** Representative photomicrographs obtained at 10× magnification with 5-μL drops of antiERα-MBs suspensions incubated with MDA-MB-436, MCF-7, SK-BR-3 and BxPC3 cancer cells.

status in intact breast cancer cells thus making it a promising tool to be implemented in useful low-cost devices designed for diagnostic and therapeutic action in breast cancer.

### Acknowledgments

This work was funded by the Basque Government within the framework of the Ertortek Program (Grant No. IE14-391), the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects, CTQ2015-64402-C2-1-R, and CTQ2011-24355 and the NANOAVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2013/MT-3029). U. Eletxigerra acknowledges Fundación Centros Tecnológicos Iñaki Goenaga for a PhD. grant. R. Villalonga acknowledges Ramón y Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Rodrigo Barderas is supported by the Ramón y Cajal Program of the MINECO. The authors would also like to acknowledge Dr. J.M. Sánchez-Puelles for kindly providing the MDA-MB-436 cell line.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.01.005>.

### References

- [1] Q.A.M. Al-Khafaji, M. Harris, S. Tombelli, S. Laschi, A.P.F. Turner, M. Mascini, G. Marrazza, *Electroanalysis* 24 (2012) 735–742.
- [2] R.C. Alves, F.B. Pimentel, H.P.A. Nouws, R.C.B. Marques, M.B. González-García, M.B.P.P. Oliveira, C. Delerue-Matos, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 19–24.
- [3] S.C. Brooks, E.R. Locke, H.D. Soule, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 6251–6253.
- [4] V.V. Chaban, A.J. Lakhter, P. Micevych, *Endocrinology* 145 (2004) 3788–3795.
- [5] E.M. Cormier, M.F. Wolf, V.C. Jordan, *Cancer Res.* 49 (1989) 576–580.
- [6] E.P. Diamandis, H.A. Fritche, H. Lilja, D.W. Chan, M.K. Schwartz (Eds.), *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications*, AACR Press, Washington, DC, ISBN: 1-890883-71-9, 2002 (513 pp.).
- [7] U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguero, S. Merino, R. Barderas, R.M. Torrente-Rodríguez, R. Villalonga, J.M. Pingarrón, S. Campuzano, *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 34–41.
- [8] V. Felzen, C. Hiebel, I. Koziollek-Drechsler, S. Reißig, U. Wolfrum, D. Kögel, C. Brandts, C. Behl, T. Morawe, *Cell Death Dis.* 6 (2015) e1812, <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.181>.
- [9] E.-O. Fourkala, A. Zaikin, M. Burnell, A. Gentry-Maharaj, J. Ford, R. Gunu, C. Soromani, G. Hasenbrink, I. Jacobs, A. Dawnay, M. Widschwendter, H. Lichtenberg-Frate, U. Menon, *Endocr. Relat. Cancer* 19 (2012) 137–147.
- [10] M. Gamella, S. Campuzano, F. Conzuelo, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Electroanalysis* 24 (2012) 2235–2243.
- [11] P.A. Gehrig, L. van Le, B. Olatidoye, J. Geradts, *Cancer* 86 (1999) 2083–2089.
- [12] A. Katchy, C. Williams, *JOVE* 84 (2014) e51385, <http://dx.doi.org/10.3791/51285>.
- [13] E. Krambovitis, G. Hatzidakis, A. Hatzoglou, S. Romain, A. Durand, A. Stefanakis, E. Castanas, *Clin. Chem.* 41/1 (1995) 48–53.
- [14] R.C.B. Marques, S. Viswanathan, H.P.A. Nouws, C. Delerue-Matos, M.B. González-García, *Talanta* 129 (2014) 594–599.
- [15] M.B. Martin, S.V. Angeloni, P. Garcia-Morales, P.F. Sholler, M.D. Castro-Galache, J.A. Ferragut, M. Saceda, *J. Endourol.* 180 (2004) 487–496.
- [16] N. Patani, L.-A. Martin, M. Dowsett, *Int. J. Cancer* 133 (2013) 1–13.
- [17] K.J. Pawlak, J.P. Wiebe, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 107 (2007) 172–179.
- [18] D. Ricketts, L. Turnbull, G. Ryall, R. Bakhshi, N.S. Rawson, J.C. Gazet, C. Nolan, R.C. Coombes, *Cancer Res.* 51 (1991) 1817–1822.
- [19] M. Rocha-Martins, B. Njaine, M.S. Silveira, *PLoS One* 7 (2012) e43028, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043028>.
- [20] V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, A. Pellicanò, R.M. Torrente-Rodríguez, A.J. Reviejo, M.S. Cosio, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* 880 (2015) 52–59.
- [21] A. Stoica, M. Saceda, A. Fakhro, H.B. Solomon, B.D. Fenster, M.B. Martin, *Endocrinology* 138 (1997) 1498–1505.
- [22] C.F. Sun, T.L. Wu, K.C. Tsao, J.T. Wu, *J. Clin. Lab. Anal.* 15 (2001) 138–143.
- [23] C.R. Taylor, R.M. Levenson, *Histopathology* 49 (2006) 411–424.
- [24] M. Widschwendter, H. Lichtenberg-Frate, G. Hasenbrink, S. Schwarzer, A. Dawnay, A. Lam, U. Menon, S. Apostolidou, E. Raum, C. Stegmaier, I.J. Jacobs, H. Brenner, *Br. J. Cancer* 10 (2009) 160–165.
- [25] J.P. Wiebe, G. Zhang, I. Welch, H.-A.T. Cadieux-Pitre, *Breast Cancer Res.* 15 (2013) R38, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3422> (2013).
- [26] E. Zacco, M.I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, M.P. Marco, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1780–1788.
- [27] S. Zhu, Y. Cao, Y. Xu, Y. Yin, G. Li, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 10298–10306.
- [28] S. Zhu, Y. Cao, Z. Ye, Y. Yin, X. Zhu, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9593–9596.



# Electrochemical Magnetoimmunosensor for Progesterone Receptor Determination. Application to the Simultaneous Detection of Estrogen and Progesterone Breast-cancer Related Receptors in Raw Cell Lysates.

U. Eletxigerra,<sup>[a]</sup> J. Martinez-Perdiguero,<sup>\*,[a]</sup> S. Merino,<sup>[a]</sup> R. Barderas,<sup>[b]</sup> V. Ruiz-Valdepeñas Montiel,<sup>[c]</sup> R. Villalonga,<sup>[c]</sup> J. M. Pingarrón,<sup>[c]</sup> and S. Campuzano<sup>\*,[c]</sup>

**Abstract:** An electrochemical magnetoimmunosensor for the determination of progesterone receptor (PR) making use of functionalized magnetic microbeads (MBs), a sandwich-type immunoassay and amperometric detection at disposable screen-printed carbon electrodes (SPCEs) was described for the first time in this work. This selective and sensitive magnetoimmunosensor, with a detection limit of 22 pg mL<sup>-1</sup>, was successfully applied to the determination of PR in raw cell lysates with just a dilution as sample treatment and exhibiting no matrix effect. The advantageous performance in terms of simplicity and assay time over commercial ELISAs makes it competitive with conventional strategies providing rapidly quantitative and

reliable results on this biomarker currently used in the clinical practice for diagnosis, follow-up and monitoring of metastatic breast cancer. In addition, a dual magnetoimmunosensor using screen-printed dual carbon electrode (SPdCE) has been implemented for the simultaneous determination of PR and estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in cell lysates. This dual receptor determination allows a more accurate diagnosis enabling a more efficient treatment. The usefulness of this dual magnetoimmunosensing platform was demonstrated by discriminating raw lysates of two types of cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-436) with significantly different PR/ER $\alpha$  expression levels.

**Keywords:** magnetoimmunosensor • amperometry • progesterone receptor • estrogen receptor • lysates • breast cancer • dual detection

## 1 Introduction

Breast cancer is the most prevalent cancer, with nearly 1.4 million new cases annually, and the second leading cause of cancer death in women. Progesterone and estrogens have been largely linked to breast cancer, and current understanding of the effective actions of these hormones implies the presence of estrogen and progesterone receptors (ER and PR, respectively) in the target cells [1].

PR belongs to the nuclear receptor (NR) superfamily of structurally related ligand-inducible transcription factors. NRs act in combination with other transcription factors to regulate the expression of gene networks involved in cell growth and development, apoptosis, homeostasis, inflammation, lipid metabolism, the reproductive cycle and other fundamental biological processes. Quantification of PR levels is very important for predicting prognosis and evaluating the outcome of endocrine therapy in breast and uterine cancer patients. Because of the critical role of PR in cell biology, it is important to measure the total amount of PR contained in different cell types and tissues. Traditional methods for monitoring PR protein levels such as Western blotting, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), ligand binding assay (LBA), enzyme immunoassay, immunohistochemistry (IHC), reporter


gene assays, and real time-PCR [2] are time consuming and not suitable to high-throughput applications.

Electrochemical biosensors constitute a very attractive alternative to current conventional methods in the clinical field because of their simplicity of use and inherent high selectivity and sensitivity. Moreover, they are able to provide accurate quantification using cost-effective instrumentation with pocket-size dimensions, ideal for integration in *point-of-care* (POC) devices [3,4]. Despite these excellent features, to the best of our knowledge no electrochemical (bio)sensor has been described so far for PR determination.

[a] U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguero, S. Merino  
Micro-NanoFabrication Unit, IK4-Tekniker, Eibar, Spain  
\*e-mail: josu.martinez@tekniker.es

[b] R. Barderas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

[c] V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, S. Campuzano  
Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain  
\*e-mail: susanacr@quim.ucm.es

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201501090>.

Furthermore, both ER and PR are known to have a significant predictive value in determining sensitivity to endocrine therapies [5–7]. Clinical data indicated that ER<sup>+</sup>/PR<sup>−</sup> breast tumors are less responsive to endocrine therapy compared with ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> tumors [8]. A lack of either ER or PR is associated with poor prognosis and usually indicates a decrease in a disease-free interval and survival [5]. Therefore, given this major role of ER and PR tumor expression in clinical outcome, the expression level of these two receptors is often used to determine patient's optimal treatment regimen. Moreover, recent studies have demonstrated that PR functions as a molecular rheostat to control transcriptional activity of the ER isoform ER $\alpha$ , which has important implications for prognosis and therapeutic intervention. Indeed, in ER $\alpha$ <sup>+</sup> breast cancers, PR is often used as a positive prognostic marker of disease outcome [9]. These findings highlight that the simultaneous interrogation of ER $\alpha$  and PR in a single experiment should provide a more accurate diagnosis, decisive in choosing an optimal treatment plan for each individual with breast cancer.

This work reports two set of results. On the one hand, an amperometric immunosensor for PR determination was developed for the first time. The proposed design implies the use of functionalized magnetic particles which have demonstrated to be powerful tools for the preparation of magneto-switchable electrodes [10], dispersible electrodes [11] and electrochemical immunosensors enabling minimization of matrix effects in the analysis of complex samples [12,13]. In this particular case, the so called magnetoimmunosensor implied a sandwich configuration using two specific antibodies against PR. The target antigen is sandwiched between the capture antibody, previously immobilized onto carboxylic acid-modified magnetic beads (HOOC-MBs) and a biotinylated detector antibody, labeled in a final step with a commercial streptavidin-horseradish peroxidase polymer (SAv-HRP). The amperometric detection of the affinity reaction was carried out by magnetically capturing the modified MBs at disposable screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and using the hydroquinone (HQ)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. The applicability of this magnetoimmunosensor was evaluated by determining the endogenous PR content in raw lysates from breast cancer cultured cells after just a dilution with the working buffer. On the other hand, this design was coupled with the one previously developed by our group for ER $\alpha$  determination [14], to allow the simultaneous determination of PR and ER $\alpha$  in cellular lysates at screen-printed dual carbon electrodes (SPdCE). This dual quantification in a single experiment overcomes disadvantages of traditional methods in terms of simplicity, quick response, high sensitivity, easy operation and low cost, which can have a positive impact in the diagnosis accuracy and efficiency of applied therapy.

## 2 Experimental

### 2.1 Apparatus and Electrodes

A  $\mu$ STAT400 potentiostat from DropSens (Spain) was employed for all electrochemical measurements. Screen-printed carbon electrodes (SPCE), consisting of a circular 4-mm carbon working electrode, a carbon counter electrode and a Ag pseudo-reference electrode were purchased from DropSens (ref. DRP-C110) and used with specific connector (DRP-CAST). Dual SPCEs, consisting of two elliptic carbon working electrodes (6.3 mm<sup>2</sup> each), a carbon counter electrode and Ag pseudo-reference electrode were also employed (ref. DRP-C1110) with their specific connector (DRP-BICAST). A MixMate mixer from Eppendorf (Germany) was used for gently shaking of the solutions during the incubations and a DynaMag-2 magnet from Invitrogen (Spain) for the magnetic separation of the MBs. Homemade poly(methyl methacrylate) docks with 1 or 2 integrated permanent magnets (AimanGZ, Spain) were used to magnetically capture the MBs over the working/s electrode/s surface during the electrochemical measurements.

### 2.2 Reagents and Solutions

Recombinant human PR, sheep anti-human PR (antiPR) and biotinylated sheep anti-human PR (biotin-antiPR) were obtained from a Human Total Progesterone R/NR3C3 DuoSet IC ELISA kit from R&D Systems Inc. (ref. DYC DY5415, Minneapolis, United States). Recombinant human estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), sheet anti-human ER $\alpha$  (antiER $\alpha$ ) and biotinylated sheep anti-human ER $\alpha$  (biotin-antiER $\alpha$ ) were obtained from a Human Total ER $\alpha$ /NR3A1 DuoSet IC ELISA kit from R&D Systems Inc. (ref. DY5715). Recombinant human ErbB2 protein was from Sino Biological Inc. (ref. SEKA10004, China) and recombinant human TNF $\alpha$  protein was purchased from PeproTech (ref. AF-300-01A, United Kingdom).

Bovine serum albumin (BSA) and streptavidin conjugated HRP enzymatic label (SAv-HRP) were from Jackson ImmunoResearch (refs. 001-000-161 and 016-030-084, respectively, United Kingdom). Human serum from human male AB plasma was purchased from Sigma-Aldrich (ref. H4522, Spain). Carboxylic acid-modified MBs (HOOC-MBs, 2.8  $\mu$ m, 30 mg mL<sup>−1</sup> Dynabeads M-270 Carboxylic Acid) were bought from Invitrogen (Spain) and used as received.

N-hydroxysuccinimide (NHS), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), ethanolamine hydrochloride (ETA), hydroquinone (HQ) and Tween 20 were from Sigma-Aldrich (Spain). Sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), sodium chloride (NaCl) and potassium chloride (KCl) were purchased from Scharlau (Spain). Ethylenediamine Tetraacetate

(EDTA) was from Fisher Bioreagents (Spain). All other chemicals were of analytical grade and ultrapure water (Millipore Milli-Q) was used throughout.

Several buffers were prepared for the experiments including: 0.01 M phosphate buffered saline at pH 7.5 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl (PBS); PBS supplemented with 1% (w/v) BSA; PBS containing 0.05% (w/v) Tween 20 (PBST); 50 mM MES buffer at pH 5.0; 50 mM phosphate buffer at pH 6.0 (PB) and 100 mM Tris-HCl buffer at pH 7.2.

### 2.3 Biofunctionalization of MBs and Sandwich Immunoassay

The washings and buffer exchange of the MBs were carried out by separation in the magnetic base for 2 min before removing the corresponding solution. The incubation and washing steps were performed in microtubes (gently shaken at 950 rpm) at 25 °C in volumes of 37.5 and 75  $\mu\text{L}$ , respectively.

For PR determination, 6  $\mu\text{L}$  of HOOC-MB suspension (as provided by the supplier) were transferred to a 1.5-mL microtube and washed twice with MES buffer for 5 minutes. HOOC groups were activated during a 35 min-incubation step in a freshly prepared 1:1 mixture of 100 mM EDC and 100 mM NHS in MES buffer. Two washing steps with MES buffer were carried out before re-suspending the activated MBs in a 313  $\text{ng mL}^{-1}$  anti-PR solution (also prepared in MES pH 5.0) during 60 min. After two more washing steps, the remaining free sites of MBs were blocked with a 1 h-incubation step with 1 M ETA solution (in PBS, pH 8.5). The bio-functionalized MBs were then washed once with pH 7.2 Tris-HCl buffer, re-suspended in 75  $\mu\text{L}$  of pH 7.5 PBST buffer and kept at 4 °C until use.

The sandwich magnetimmunoassay was carried out by sequential incubation of the anti-PR-modified MBs with: i) PR standards/samples (60 min); ii) 2.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  biotinylated antiPR (60 min); iii) 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  SAV-HRP (10 min) solutions all prepared in PBS supplemented with 1% (w/v) BSA. Two washing steps with PBST were performed after each incubation step.

Dual PR and ER $\alpha$  determination at SPdCEs was accomplished by simultaneously preparing two different batches of MBs each of them suitable for the determination of each protein receptor following the protocol described above for PR and that described in Eletxigerra et al. [14] for ER $\alpha$ .

Thereafter, the modified MBs were re-suspended in 150 or 15  $\mu\text{L}$  of pH 6.0 PB buffer to perform the single or dual determination, respectively. From these volumes, three replicates (45 and 4.5  $\mu\text{L}$  per measurement at SPCE and SPdCE, respectively, see Section 2.4) were made in each case, so that it can be stated that a 2- $\mu\text{L}$  effective volume of the MBs stock dispersion was used for each measurement.

### 2.4 Amperometric Detection

For the single PR determination, 45  $\mu\text{L}$  of the MBs solution prepared as described in Section 2.3 were gently pipetted on the SPCE working electrode where they were magnetically trapped by means of the homemade magnetic dock (Figure 1a). Dual quantification at the SPdCEs was accomplished by capturing magnetically 4.5  $\mu\text{L}$  of the re-suspended MBs modified for ER $\alpha$  determination on one of the two SPdC working electrodes (WE 1 in Figure 1b) and 4.5  $\mu\text{L}$  of the modified MBs for PR determination on the another working electrode (WE 2 in Figure 1b) by keeping the SPdCE in an horizontal position after placing it in the homemade magnet holding block.

For both the single and dual determinations, the ensemble magnet holding block/SPCE, or SPdCE with the captured modified MBs was immersed into an electrochemical cell containing 8 mL of 0.05 M PB pH 6.0 and 1.0 mM HQ (prepared just before the electrochemical measurement). Amperometric measurements were carried out at  $-0.20$  V (vs. Ag pseudo-reference electrode). After 60 s of baseline acquisition, 40  $\mu\text{L}$  of a 0.1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution were added to trigger the electrochemical reactions displayed in Fig. 1 and the current values measured at 200 s were employed as the analytical signals. At least 3 replicates of each experimental point were measured and averaged to obtain the data provided in this work.

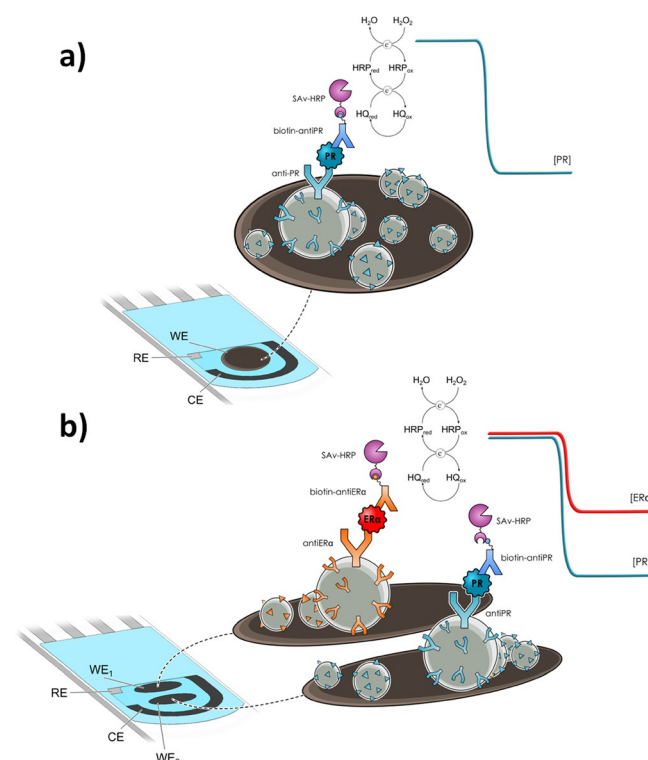


Fig. 1. Schematic display of the preparation of a disposable magnetimmunosensor for PR quantification as well as the involved immunoassay and the reactions used for the electrochemical detection. The methodology for the simultaneous detection of PR and ER $\alpha$  is also shown (Figure 1b).



## 2.5 Cell Culture and Lysate Production

MCF-7 (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/ErbB2<sup>-</sup>), MDA-MB-436 (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/ErbB2<sup>-</sup>) and SK-BR-3 (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/ErbB2<sup>+</sup>) breast cancer cell lines were grown according to established protocols in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin, and 2.5 mM L-glutamine (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with recommended nutrients [15].

To lyse the cells, they were washed with cold PBS, incubated for 5 min with PBS 4 mM EDTA to detach them from the plates, centrifuged at 1,200 rpm to remove PBS 4 mM EDTA, and subjected to the addition of 1 mL cold lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 1X protease inhibitor cocktail, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM activated sodium orthovanadate. Then, the cells were incubated on ice for 10 min, passed through a 25 gauge needle attached on a 1 mL syringe 10 times and transferred to a microcentrifuge tube. The cell lysate was then clarified by centrifuging at 13,200 rpm at 4°C for 15 min. Total protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and the lysates stored at -80°C until further use.

## 2.6 Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) and Immunodetection Analysis

Cancer cell lysates (25 µg of each protein extract) were analyzed by 10% SDS-PAGE with Coomassie Blue R-250 staining (Sigma-Aldrich).

For immunodetection [16], 50 µg of each protein extract were run in parallel using 10% SDS-PAGE. Then, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra) using semi-dry transfer (Bio-Rad) [17]. After blocking, membranes were incubated at optimized dilutions with alternatively antiPR monoclonal antibody (R&D Systems) or anti-tubulin monoclonal antibody (Sigma) as loading control followed by incubation with SAV-HRP (R&D Systems) at 1:1000 dilution or HRP-anti-mouse IgG (Pierce) at 1:5000 dilution, respectively. Specific reactive proteins were visualized with SuperSignal West Pico Maximum Sensitivity Substrate (Pierce).

## 2.7 Analysis of Real Samples

The PR magnetoimmunosensor was employed for the determination of this receptor in spiked human serum, cell lysates as well as for its detection in intact breast cancer cells. The antiPR-MBs were re-suspended in a 37.5-µL aliquot of the appropriately diluted sample and the protocol described in Section 2.3 was followed. In order to allow spiking with the PR standard, serum samples were 25% diluted in PBS buffer containing 1% BSA. Regarding the cell lysates, they were diluted in PBST up to a final amount of 2.5 µg while the breast cell cultures

were assayed at concentrations of  $(1-10) \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> prepared in filtered PBS. Since no matrix effect was apparent under the mentioned conditions, quantification of PR in spiked human serum and cell lysates was carried out by interpolation of the measured amperometric signals into the calibration graph constructed with PR standards.

Concerning the simultaneous detection of PR and ERα, it was carried out in the cell lysates. The antiPR-MBs and antiERα-MB, batches were prepared according to the procedures described in Section 2.3 and Eletxigerra et al. [14], respectively, and incubated in 2.5 µg PBST-diluted cell lysates.

## 3 Results and Discussion

The schematic display of the magnetoimmunosensor preparation, the employed immunoassay and the reactions involved in the electrochemical detection are shown in Figure 1. Capture antiPR antibodies were covalently immobilized on HOOC-MBs previously activated using EDC/NHS chemistry. Subsequently, the unreacted activated groups of the HOOC-MBs were blocked with ETA and the target protein was sandwiched with biotin-antiPR, which was finally labeled with a HRP conjugate. The MBs bearing the bioconjugates were subsequently captured magnetically on the SPCE and the electrochemical detection was carried out as described in Section 2.4. It is important to note that the employed methodology means that the SPCEs acted only as the electrochemical transducer while all the affinity reactions occurred on the surface of the MBs, thus minimizing unspecific adsorptions of the bioreagents on the electrode surface and largely simplifying the whole process.

### 3.1 Optimization of Experimental Variables

The different experimental variables involved in the magnetoimmunosensor preparation and functioning were optimized taking as a decision criterion the comparison of the amperometric responses measured in the absence and in the presence of 1.0 ng mL<sup>-1</sup> PR standards.

As examples of these optimization studies, the dependence of the magnetoimmunosensor amperometric responses for PR with the capture and detector antibodies concentration is shown in Figure 2. Figure 2a shows that, while no relevant changes were observed for the amperometric signals measured with no PR (black bars), the current in the presence of 1.0 ng mL<sup>-1</sup> PR (white bars) increased sharply until a capture antiPR loading of 0.31 µg mL<sup>-1</sup> and decreased notably for larger loadings which is most likely due to a loose of efficiency in the PR recognition when high amounts of capture antibody are immobilized [18]. Regarding the detector antibody concentration (Figure 2b), the amperometric responses increased linearly with such concentration up to 8.0 µg mL<sup>-1</sup> and decreased also for larger antibody loading. As a result of these studies, and taking into account

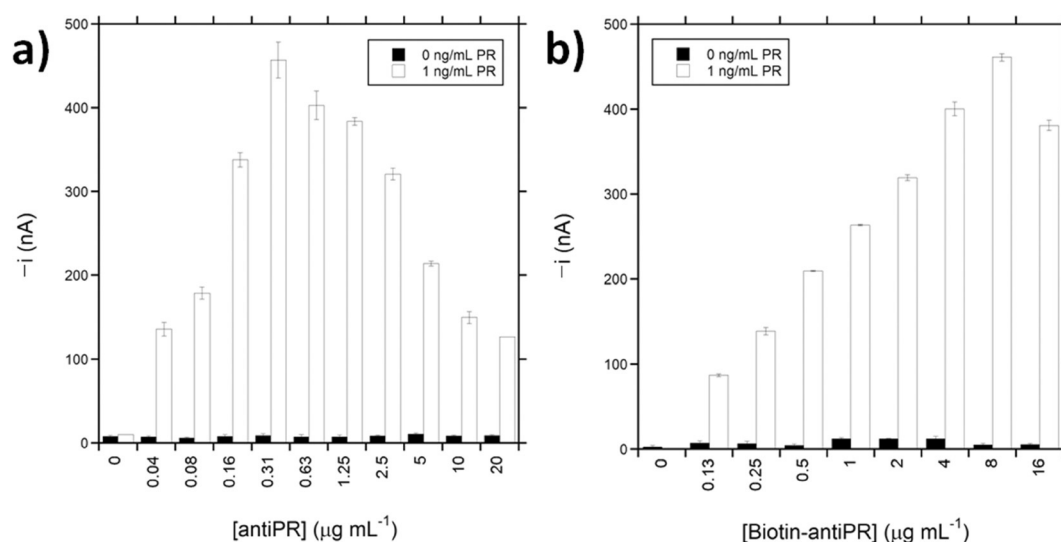


Fig. 2. Dependence of the amperometric responses measured in the absence (black bars) and in the presence (white bars) of 1.0 ng mL<sup>-1</sup> PR standard solution with the capture antibody loading immobilized on COOH-MBs (a) and the biotinylated detector antibody concentration (b). Error bars estimated as triple of the standard deviation ( $n=3$ ).

also the compromise between appropriate sensitivity and assay cost, loadings of 313 ng mL<sup>-1</sup> and 2.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were selected for capture and detector antibodies, respectively.

Table S1 collects all the tested variables, with the corresponding evaluated ranges, and the selected values for further experiments. Other experimental variables, such as the applied detection potential, the volume of HOOC-MBs suspension, the dilution of the SAv-HRP reconstituted solution and the incubation time in this solution were the same than those previously optimized in an earlier work [19].

In addition to the experimental variables collected in Table S1, we evaluated also the possibility of performing the whole assay in just one single step involving incubation of the antiPR-MBs in a mixture solution containing the target antigen, the biotin-antiPR and SAv-HRP. The amperometric measurements made under these conditions for 10 ng mL<sup>-1</sup> PR were not significantly different from those obtained without PR, probably due to an increased steric hindrance when the different immunoreagents were mixed in homogeneous solution before recognizing by the antiPR-MBs. Accordingly, a 3-sequential steps protocol was employed for the implementation of the magnetoimmunosensor.

### 3.2 Analytical Characteristics

Under the selected experimental conditions, a calibration plot was constructed with PR standards (prepared in PBS buffer containing 1% BSA). A linear relationship ( $r=0.997$ ) (Fig. S1) was found over a 73–1,500 pg mL<sup>-1</sup> PR concentration range with slope and intercept values of  $(0.36 \pm 0.01)$  nA mL pg<sup>-1</sup> and  $(-5 \pm 8)$  nA, respectively. The detection (LOD) and determination (LOQ) limits, calculated as the concentrations corresponding to signals three and ten times larger than the blank standard deviation ( $n=10$ ), were 22 and 73 pg mL<sup>-1</sup>, respectively.

Amperometric measurements for 1.0 ng mL<sup>-1</sup> PR standard solutions carried out with 5 different magnetoimmunosensors prepared in the same manner yielded a very low relative standard deviation (RSD) value of 1.1%, indicating the great reproducibility of the whole magnetoimmunosensor fabrication and signal transduction protocols used.

### 3.3 Selectivity of the Immunosensor

The selectivity of the sensor was evaluated against different human non-target proteins such as ER $\alpha$ , ErbB2 and TNF $\alpha$ . The amperometric signals provided by the magnetoimmunosensor for 0 and 400 pg mL<sup>-1</sup> PR as well as for 10 ng mL<sup>-1</sup> of each of these non-target proteins are shown in Figure 3. As it can be observed, none of the non-target proteins tested gave an amperometric response significantly different to that measured in the absence of PR, thus demonstrating the selectivity of the developed immunosensor.

### 3.4 Quantification of PR in Human Serum and Cell Lysates

The feasibility of the developed methodology for clinical analysis was evaluated by analyzing spiked human serum samples and quantifying the endogenous PR content in lysates from breast cancer cells expressing variable levels of this protein receptor.

In order to allow spiking with the available commercial PR standard, serum samples were 25% diluted in PBS buffer containing 1% BSA. No matrix effect was observed since the slope value  $(0.32 \pm 0.02)$  nA mL pg<sup>-1</sup> of the linear calibration graph constructed from the serum diluted sample adequately spiked with growing amounts of the standard PR solution up to 1,500 pg mL<sup>-1</sup>, was not statistically different than the slope value obtained with



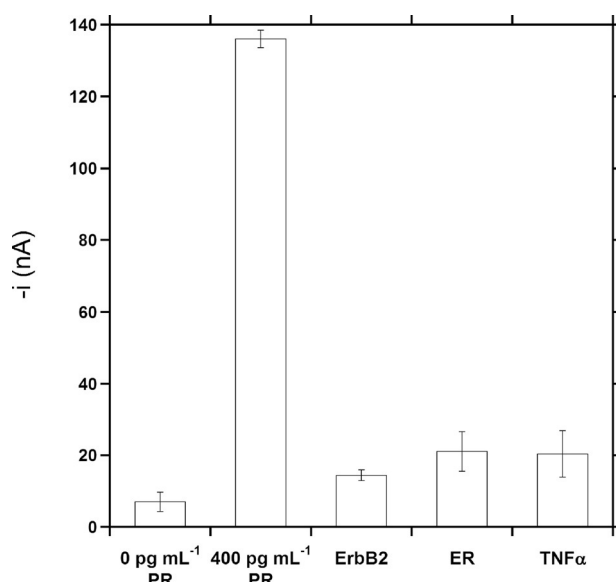


Fig. 3. Magnetoimmunosensor selectivity. Amperometric measurements provided by the magnetoimmunosensor for standards solutions of 0 and 400  $\text{pg mL}^{-1}$  PR as well as for 10  $\text{ng mL}^{-1}$  ErbB2, ER $\alpha$  and TNF $\alpha$ . Error bars estimated as triple of the standard deviation ( $n=3$ ).

standard PR solutions ( $0.36 \pm 0.01 \text{ nA mL pg}^{-1}$ ). Accordingly, PR quantification could be accomplished by interpolation of the measured current for the samples into the calibration plot prepared with standards. Mean recoveries for serum samples spiked with 400 and 1600  $\text{pg mL}^{-1}$  PR were 94.7 and 100.3 % ( $\text{RSD}_{n=3}$  of 1.9 and 3.6 %), respectively. These results demonstrated the usefulness of the magnetoimmunosensor for the reliable determination of PR at  $\text{pg mL}^{-1}$  levels in human serum despite the complexity of this type of samples.

The magnetoimmunosensor was also used as an *in situ* testing system to interrogate the ER $\alpha$  levels in lysates of three model breast cancer cell lines expressing varying PR levels: MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-436. As expected considering the PR $^{+}$  status of MCF-7 cells [20], the magnetoimmunosensor response was significantly larger for this cell line (Figure 4). This is in agreement with the noticeable expression observed by SDS-PAGE (Figure S2). No matrix effect was apparent when the lysate amount used was equal or lower than 2.5  $\mu\text{g}$ . Therefore, the target protein was determined also by interpolation of the amperometric signals measured from the lysates into the calibration graph constructed with PR standards (Figure S1). The obtained results are summarized in Table 1 and compared with those provided by a commercial ELISA kit using the same immunoreagents. No statistically significant differences between the mean values calculated with both methods were found at 0.05 significance level. It is also worth mentioning that the PR concentration calculated with the magnetoimmunosensor in the MCF-7 lysates,  $(128 \pm 18) \text{ fmol mg}^{-1}$ , is in agreement with those reported by other authors,  $111 \pm 16$  [21], 47.1–114.0 [22] and 115 [23].

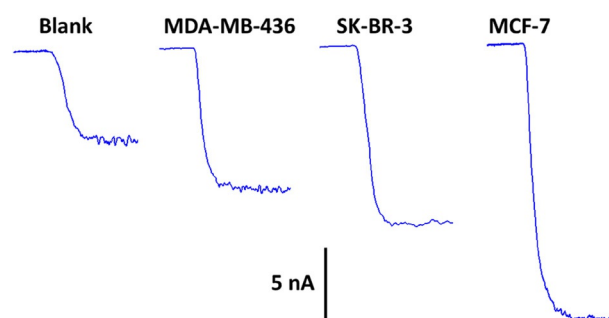


Fig. 4. Testing of PR expressing levels in cell lysates. Amperometric responses measured with the magnetoimmunosensor in the absence (blank) and in the presence of 2.5  $\mu\text{g}$  of cell lysates.

Table 1. PR quantification (in  $\text{pg } \mu\text{g}^{-1}$ ) in cell lysates from different breast cancer cells with the developed amperometric magnetoimmunosensor and comparison with the results obtained by a commercial ELISA spectrophotometric kit.

Cancer cell	ELISA	Magnetoimmunosensor
MCF-7	$(15 \pm 3)$ $\text{RSD}_{n=3} = 3.2 \%$	$(15 \pm 2)$ $\text{RSD}_{n=3} = 2.1 \%$
MDA-MB-436	$(4.3 \pm 0.6)$ $\text{RSD}_{n=3} = 0.6 \%$	$(3.9 \pm 0.7)$ $\text{RSD}_{n=3} = 0.7 \%$
SK-BR-3	$(6 \pm 1)$ $\text{RSD}_{n=3} = 1.4 \%$	$(7.2 \pm 0.8)$ $\text{RSD}_{n=3} = 0.8 \%$

These results demonstrated fairly well the excellent operational characteristics of the developed magnetoimmunosensor to accurately determine the target protein even in the presence of a large excess of other non-target cell components with just a sample dilution treatment.

It is also important to notice that the MCF-7 cell line used as positive control shows, in fact, an intermediate PR expression level in comparison with other human breast cancer cell lines such as T47D, which presents an approximately 20-fold higher PR mRNA level [24,25]. Therefore, the magnetoimmunosensor ability to clearly differentiate cells expressing an intermediate PR level highlights the potentiality of the developed methodology. In addition, it is important to remark that only 2.5  $\mu\text{g}$  of cell lysates are needed for the quantification of the target protein conversely to the 20–50  $\mu\text{g}$  required with conventional immunochemical assays such as Western blotting to detect this protein. Moreover, although the sensitivity of the approach has demonstrated to be sufficient for the applications described in this work, such sensitivity could be enhanced, as it could be required for early detection, by means of different signal amplification strategies based on the use of commercial DNA dendrimers modified with multiple labels [26] or bioconjugates of nanomaterials, HRP and detector antibodies as labels [27].

### 3.5 *In vitro* Detection of PR-overexpressing Cells

The magnetoimmunosensor was evaluated for the direct *in vitro* monitoring of PR status in the cancer cells. Figure 5 compares the amperometric responses obtained

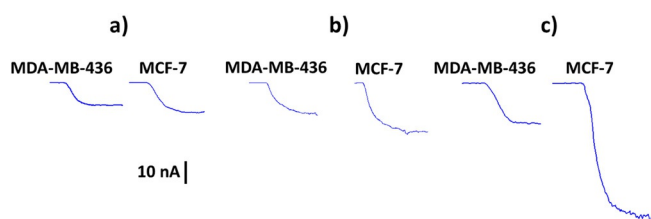


Fig. 5. Assessment of PR status in MCF-7 and MDA-MB-436 cells using the developed magnetobiosensor. Amperometric responses measured in the presence of 12,500 a), 62,500 b) and 125,000 c) cancer cells.

for MCF-7 and MDA-MB-436 at three different cell densities. As it can be seen, significantly larger amperometric responses were obtained for the MCF-7 breast cancer cells demonstrating that the magnetobiosensor allowed a clear discrimination between intermediate and low PR expression levels in cell lines. A rough estimation of the target protein amount per number of cells was accomplished by interpolating the amperometric measurements into the calibration curve constructed with PR standards. The concentration found of  $\sim 275$  ng PR per  $10^7$  MCF-7 cells is in good agreement with the specifications for the ELISA kit whose components were used for implementing the PR magnetobiosensor. These results demonstrated the possibility to unequivocally discriminate human cancer cells expressing high PR levels.

### 3.6 Simultaneous Detection of PR and ER $\alpha$ in Cells Lysates

As it was commented in the Introduction section, the simultaneous determination of PR and ER $\alpha$  in a single experiment is becoming more and more relevant since PR modulates ER $\alpha$  in breast cancer [9]. Therefore, the feasibility of coupling the developed methodology for PR quantification with the recently developed approach for ER $\alpha$  determination was evaluated. In order to do that, quantification of the endogenous content of both protein receptors in raw cell lysates was carried out.

The fundamentals of the dual biosensor design and the simultaneous electrochemical determination of PR and ER $\alpha$  using two different batches of functionalized MBs and SPdCEs are schematized in Figure 1b. MBs bearing the HRP-labeled sandwich PR and ER $\alpha$  immunocomplexes were magnetically captured on the corresponding working electrode (WE 1 and WE 2) of the SPdCE and amperometric detection at  $-0.20$  V (vs Ag pseudo-reference electrode) of the catalytic current produced upon  $\text{H}_2\text{O}_2$  addition using HQ as redox mediator in solution was employed to monitor each target analyte concentration.

The endogenous content of both protein receptors in raw cell lysates from two different metastatic breast cancer cell lines expressing different levels of PR and ER $\alpha$ : MCF-7 (PR $^+$ /ER $\alpha^+$ ) and MDA-MB-436 (PR $^-$ /ER $\alpha^-$ ) were measured. The amperometric traces (1) and

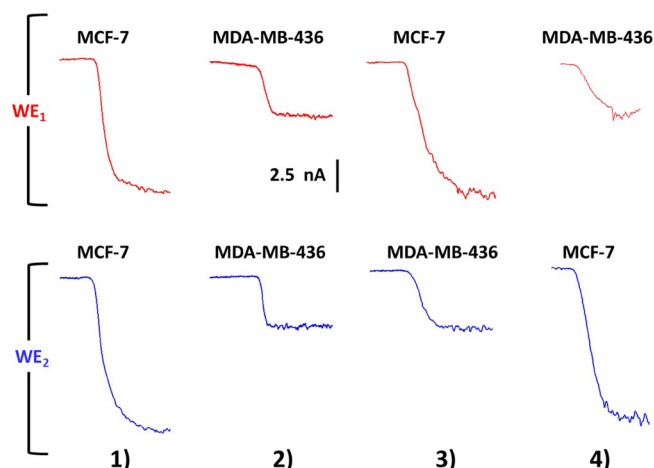


Fig. 6. Amperometric traces recorded simultaneously at the dual magnetobiosensor for determination of MCF-7 and MDA-MB-436 cell lysates: antiER $\alpha$ -MBs and antiPR-MBs incubated in MCF-7 cell lysates (1); antiER $\alpha$ -MBs and antiPR-MBs incubated in MDA-MB-436 cell lysates (2); antiER $\alpha$ -MBs incubated in MCF-7 cell lysate and antiPR-MBs incubated in MDA-MB-436 cell lysate (3); antiER $\alpha$ -MBs incubated in MDA-MB-436 cell lysate and antiPR-MBs incubated in MCF-7 cell lysate (4).

(2) shown in Figure 6 are consistent with the higher expression of both target biomarkers in the MCF-7 cells compared to MDA-MB-436 cells, thus confirming the reliability of the approach to detect simultaneously the endogenous content of both biomarkers in raw cell lysates samples.

Amperograms (3) show the response obtained when antiER $\alpha$ -MBs and antiPR-MBs were incubated in MCF-7 and MDA-MB-436 cell lysates, respectively. In addition, amperometric traces (4) display the measured currents when antiER $\alpha$ -MBs are incubated in MDA-MB-436 cell lysate and antiPR-MBs in MCF-7 cell lysate. As it can be deduced from the comparison of the amperometric signals (3) and (4) with (1) and (2), no significant cross-talking between the adjacent working electrodes occurred since similar responses for each biomarker were measured independently of the other receptor expression level. Therefore, the magnetobiosensor responses could be attributed to the selective capture of the PR and ER $\alpha$  by the antiPR-MBs and antiER $\alpha$ -MBs, respectively, which endorsed the viability of the dual magnetobiosensor for the simultaneous determination of both analytes and the feasibility to discriminate between cells with different status of both receptors (PR $^+$ /ER $\alpha^+$ , PR $^-$ /ER $\alpha^-$ , PR $^+$ /ER $\alpha^-$  and PR $^-$ /ER $\alpha^+$ ).

## 4 Conclusions

The first disposable amperometric magnetobiosensor for the determination of PR is described in this work using disposable electrochemical transducers, commercial functionalized MBs and a pair of specific antibodies. After characterizing its excellent analytical performance and demonstrating its successful applicability to the determi-

nation of PR in serum and raw cell lysates, this magneto-immunosensor was coupled with another one recently developed for the determination of ER $\alpha$  to prepare a dual amperometric platform for direct and simultaneous determination of both biomarkers in raw cell lysates in about 2.5 h. The demonstrated capabilities of the developed biosensing tools, both for the individual PR determination and simultaneous detection of PR and ER $\alpha$ , compare well and bring some improvements in terms of simplicity and assay time with respect to traditional methodologies. Moreover, the low cost and easy automation and miniaturization of the employed instrumentation, together with the use of disposable mass-produced electrodes make the developed approaches promising, attractive and user-friendly alternative tools for the development of POC devices, readily translated to the determination of other biomarkers, with potential applications in a wide variety of preclinical and clinical scenarios. It is worth to mention also that the presented dual design could be easily expanded to the detection of a larger number of biomarkers simply by using an appropriate multiplexed electrochemical platform. These attractive features make them very promising in research, onsite accurate diagnosis and prediction of breast cancer.

## Acknowledgements

This work was funded by the Basque Government within the frame work of the Etortek Program (Grant no. IE14-391), the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects, CTQ2012-34238, CTQ2011-24355 and the NANOAVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2013/MT-3029). R. Villalonga acknowledges a Ramón y Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Rodrigo Barderas is supported by the Ramón y Cajal Programme of the MINECO. The authors would also like to acknowledge Dr. J. M. Sánchez-Puelles for kindly providing the MDA-MB-436 cell line.

## References

- [1] J. P. Wiebe, G. Zhang, I. Welch, H.-A. T. Cadieux-Pitre, *Breast Cancer Research* **2013**, 15:R38, doi:10.1186/bcr3422.
- [2] P. de Cremoux, C. Tran-Perennou, B. L. Brockdorff, E. Boudou, N. Brünner, H. Magdelénat, A. E. Lykkesfeldt, *Endocrine-Related Cancer* **2003**, 10, 409–418.
- [3] Q. A. M. Al-Khafaji, M. Harris, S. Tombelli, S. Laschi, A. P. F. Turner, M. Mascini, G. Marrazza, *Electroanalysis* **2012**, 24, 735–742.
- [4] R. C. B. Marques, S. Viswanathan, H. P. A. Nouws, C. Deleue-Matos, M. B. González-García, *Talanta* **2014**, 129, 594–599.
- [5] E. M. Cormier, M. F. Wolf, V. C. Jordan, *Cancer Research* **1989**, 49, 576–580.
- [6] S. A. Fuqua, Y. Cui, *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, 87, S3–10.
- [7] M. B. Martin, S. V. Angeloni, P. Garcia-Morales, P. F. Sholler, M. D. Castro-Galache, J. A. Ferragut, M. Saceda, *Journal of Endocrinology* **2004**, 180, 487–496.
- [8] H.-J. Kim, X. Cui, S. G. Hilsenbeck, A. V. Lee, *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 1013s–1018s.
- [9] H. Mohammed, I. A. Russell, R. Stark, O. M. Rueda, T. E. Hickey, G. A. Tarulli, A. A. Serandour, S. N. Birrell, A. Bruna, A. Saadi, S. Menon, J. Hadfield, M. Pugh, G. V. Raj, G. D. Brown, C. D'Santos, J. L. L. Robinson, G. Silva, R. Launchbury, C. M. Perou, J. Stingl, C. Caldas, W. D. Tilley, J. S. Carroll, *Nature* **2015**, 523, 313–317.
- [10] E. Katz, *Electroanal.* in press, DOI: 10.1002/elan.201500635.
- [11] S. Moraes-Silva, R. Tavalhaie, M. T. Alam, K. Chuah, J. J. Gooding, *Electroanal.* in press, DOI: 10.1002/elan.201500530.
- [12] E. Zacco, M. I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, M. P. Marco, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 1780–1788.
- [13] V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, A. Pellicanò, R. M. Torrente-Rodríguez, A. J. Reviejo, M. S. Cosio, J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* **2015**, 880, 52–59.
- [14] U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguerro, S. Merino, R. Barderas, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, S. Campuzano, *Sensing and Bio-sensing Research* **2016**, submitted.
- [15] U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguerro, S. Merino, R. Barderas, R. M. Torrente-Rodríguez, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, S. Campuzano, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 70, 34–41.
- [16] R. Barderas, M. Mendes, S. Torres, R. A. Bartolome, M. Lopez-Lucendo, R. Villar-Vazquez, A. Pelaez-Garcia, E. Fuente, F. Bonilla, J. I. Casal, *Mol. Cell Proteomics* **2013**, 12, 1602–1620.
- [17] R. Barderas, R. Villar-Vazquez, M. J. Fernandez-Acenero, I. Babel, A. Pelaez-Garcia, S. Torres, J. I. Casal, *Sci. Rep.* **2013**, 3, 2938. <http://dx.doi.org/10.1038/srep02938>.
- [18] R. C. Alves, F. B. Pimentel, H. P. A. Nouws, R. C. B. Marques, M. B. González-García, M. B. P. P. Oliveira, C. Deleue-Matos, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 64, 19–24.
- [19] U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguerro, S. Merino, R. Villalonga, J. M. Pingarrón, S. Campuzano, *Anal. Chim. Acta* **2014**, 838, 37–44.
- [20] M. Rondón-Lagos, L. Verdun Di Cantogno, C. Marchiò, N. Rangel, C. Payan-Gomez, P. Gugliotta, C. Botta, G. Bussoleti, S. R. Ramírez-Clavijo, B. Pasini, A. Sapino, *Molecular Cytogenetics* **2014**, 7:8, doi:10.1186/1755-8166-7-8.
- [21] L. J. Brandes, M. W. Hermonat, *Cancer Research* **1983**, 43, 2831–2835.
- [22] G. Konecny, G. Pauletti, M. Pegram, M. Untch, S. Dandekar, Z. Aguilar, C. Wilson, H.-M. Rong, I. Bauerfeind, M. Felber, H.-J. Wang, M. Beryt, R. Seshadri, H. Hepp, D. J. Slamon, *Journal of the National Cancer Research Institute* **2003**, 95, 142–153.
- [23] F. Un, B. Zhou, Y. Yen, *Anticancer Research* **2012**, 32, 4685–4690.
- [24] T. Sivik, A. Jansson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 422, 109–113.
- [25] A. B. Adomas, S. A. Grimm, C. Malone, M. Takaku, J. K. Sims, P. A. Wade, *BMC Cancer* **2014**, 14:278, doi:10.1186/1471-2407-14-278.
- [26] F. Wei, W. Liao, Z. Xu, Y. Yang, D. T. Wong, C.-M. Ho, *Small* **2009**, 5, 1784–1790.
- [27] G. Wang, X. He, L. Chen, Y. Zhu, X. Zhang, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, 116, 714–719.

Received: November 11, 2015

Accepted: November 25, 2015

Published online: December 10, 2015